

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Mecanismos de resistência do melanoma
metastático à quimioterapia e abordagem
de novos alvos terapêuticos**

Catarina da Silva Mineiro Melício

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Mecanismos de resistência do melanoma
metastático à quimioterapia e abordagem
de novos alvos terapêuticos**

Catarina da Silva Mineiro Melício

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientador: Professora Auxiliar Maria Eduarda Mendes

2019

Resumo

O melanoma é o tipo de cancro de pele com menor número de casos, no entanto, é o responsável pelo maior número de mortes. O melanoma metastático está associado a uma taxa de sobrevivência reduzida que varia consoante o local onde as metástases se localizam.

Durante muitos anos, o tratamento padrão para o melanoma em estadios avançados era a combinação da dacarbazina, um agente alquilante, com elevadas doses de interleucina-2. No entanto, as células cancerígenas são caracterizadas pelo desenvolvimento frequente de mecanismos de resistência aos fármacos utilizados, sendo esta uma das principais limitações no tratamento dos doentes.

Nos últimos anos, o tratamento do melanoma metastático apresentou grandes avanços decorrentes de descobertas, como o conhecimento das alterações que ocorrem a nível molecular. Estas descobertas permitiram a identificação de novos alvos, que levou ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

O sistema imunitário desempenha um papel fundamental na eliminação das células cancerígenas, no entanto, quando ativados, os linfócitos T expressam à superfície proteínas que competem pela ligação a moléculas que se encontram nas células apresentadoras de antígenos, levando à inibição da resposta imunitária. Assim, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais que bloqueiam *checkpoints* imunológicos, como o ipilimumab (anti-CTLA-4), pembrolizumab (anti-PD-1) e o nivolumab (anti-PD-1).

Ao longo dos últimos anos, observou-se um aumento no desenvolvimento das terapêuticas direcionadas, como o vemurafenib e o dabrafenib, após a descoberta de que o melanoma geralmente apresenta mutações no gene BRAF (40 a 60% dos casos), sendo 90% destas mutações BRAFV600E.

Estes novos alvos terapêuticos permitiram uma alteração no paradigma comum da baixa sobrevivência dos doentes com melanoma metastático, uma vez que estas novas estratégias conduzem a uma nova realidade, obtendo-se elevadas taxas de resposta e controlo prolongado da doença.

Palavras-chave: melanoma metastático, terapêuticas sistémicas, resistência à quimioterapia, imunoterapia, terapêuticas direcionadas

Abstract

Melanoma is the type of skin cancer with fewest cases, however, it's responsible for the highest number of deaths. Metastatic melanoma is associated with a reduced survival rate that varies with metastases localization.

For many years, the standard treatment for advanced melanoma was the combination of dacarbazine, an alkylating agent, with high doses of interleukin-2. However, cancer cells are characterized by the development of drug resistance, which is one of the limitations of the treatment.

In recent years, great advances occurred in the treatment of metastatic melanoma resulting from knowledge of changes that occurred at molecular level, allowing the identification of new targets. This knowledge led to the development of new therapeutic agents.

It is known that immune system plays a crucial role in the elimination of cancer cells, however, when activated, T lymphocytes express proteins on their surface that compete for binding to molecules found in antigen-presenting cells, leading to inhibition of the immune response. Thus, monoclonal antibodies are developed which blocking immunological *checkpoints*, such as ipilimumab (anti-CTLA-4), pembrolizumab (anti-PD-1) and nivolumab (anti-PD-1).

Over the past few years, it was observed an increase in the development of target therapies such vemurafenib and dabrafenib, following the discovery that melanoma usually has BRAF mutations (40%-60% of cases), 90% of which BRAFV600E mutations.

These new therapeutic agents cause a change in the low survival rate of metastatic melanoma patients, as these new strategies lead to a new reality, resulting in high responses rates e prolonged disease control.

Keywords: metastatic melanoma, systemic therapies, chemotherapy resistance, immunotherapy, target therapy

Agradecimentos

Terminada a presente monografia, torna-se imperativo expressar um sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Maria Eduarda Mendes, pela sua orientação, por toda a disponibilidade e ajuda, fundamentais para a realização desta monografia.

À minha família, obrigada por me acompanharem todos os dias e por tornarem este percurso de cinco anos mais fácil. Agradeço por todos os conselhos, por acreditarem em mim e pela força que me dão.

Aos meus pais, expresso um profundo agradecimento pelo apoio, carinho e pelos valores que me transmitem. Obrigada por todo o amor que me dão e por me fazerem sempre acreditar que, com esforço e dedicação, todos os sonhos se tornam alcançáveis. Obrigada por serem uma inspiração e um exemplo a seguir.

Ao Duarte, agradeço por todas as vezes que acreditaste em mim quando eu própria era incapaz de o fazer. Agradeço-te todo o amor e todas as palavras sábias que me diriges. Obrigada por seres o meu equilíbrio.

Ao Miguel e à Mafalda agradeço por continuarmos a crescer juntos todos os dias. Agradeço todas as palavras conselheiras e por me mostrarem sempre o caminho certo a seguir. À Bruna, obrigada por teres sempre uma palavra amiga e por estares sempre presente. Aos três, obrigada por todos os momentos de alegria e por todos os risos partilhados. Convosco por perto, tudo se torna mais fácil de ultrapassar.

À Sofia e às Catarina, obrigada por todo o companheirismo ao longo dos últimos anos e por todos os desafios que ultrapassamos juntas. Obrigada pelas palavras certas e, em especial, obrigada pela vossa amizade.

A todos os que constituem a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a formação académica que me proporcionaram.

Por último, agradeço aos meus avós que mesmo ausentes, estiveram sempre presentes. Obrigada por iluminarem o meu caminho e por viverem sempre em mim. Pela alegria que teriam ao ver-me terminar esta etapa da minha vida, esta conquista é também vossa.

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| FDA | Food and Drug Administration |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| INF- α | Interferão- α |
| UV | Ultravioleta |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| MC1R | Melanocortin 1 receptor |
| BRAF | v-Raf murine sarcoma viral oncogene |
| NF1 | Neurofibromin-1 |
| NRAS | Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| LDH | Lactato Desidrogenase |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| FAMMM | Familial Atypical Multiple Mole Melanoma |
| NICE | National Institute for Health and care Excellence |
| DTIC | Dacarbazina |
| TMZ | Temozolomide |
| MDEPT | Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy |
| MDR | Multiple Drug Resistance |
| ABC | ATP-binding cassette |
| TMDs | Domínios transmembranares hidrofóbicos |
| NBDs | Nucleótidos hidrofílicos |
| Pgp | Glicoproteína P |
| GST | Glutathione-S-transferase |
| GSH | Glutathione |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| MGMT | O6-methylguanine DNA methyltransferase |
| APNG | N-methylpurine-DNA glycosylase |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerase |
| CTLA-4 | Antígeno 4 do linfócito T citotóxico |

| | |
|------|---------------------------------------|
| PD-1 | Proteína de morte programada 1 |
| EMA | European Medicines Agency |
| NK | Natural Killer |
| RAF | Rapidly accelerated fibrosarcoma |
| MEK | MAPK kinase |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| GEF | Guanine nucleotide Exchange factor |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| RTK | Receptor Tyrosine Kinase |
| RAS | Rat sarcoma |

Índice

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Introdução | 10 |
| 2. | Melanoma metastático | 10 |
| 3. | Epidemiologia | 14 |
| 4. | Fatores de risco | 16 |
| 5. | Diagnóstico | 17 |
| 6. | Terapêuticas sistêmicas no tratamento do melanoma | 19 |
| 7. | Materiais e métodos | 20 |
| 8. | Quimioterapia no tratamento do melanoma metastático | 21 |
| 9. | Mecanismos de resistência à quimioterapia..... | 26 |
| 9.1. | Transporte de fármacos e resistência mediada por bombas de efluxo | 29 |
| 9.2. | Resistência mediada por alteração da ativação enzimática..... | 31 |
| 9.3. | Resistência mediada pela modulação da via apoptótica | 31 |
| 9.4. | Resistência mediada por alteração na reparação do ADN | 33 |
| 10. | Abordagem de novos alvos terapêuticos no melanoma metastático..... | 34 |
| 10.1. | Imunoterapia | 35 |
| 10.1.1. | Terapêutica anti CTLA-4 | 36 |
| 10.1.2. | Terapêutica anti PD-1 | 38 |
| 10.1.3. | Terapêutica combinada com anti-CTLA-4 e anti-PD-1..... | 42 |
| 10.2. | Terapêuticas direcionadas | 42 |
| 10.3. | Terapêutica conjunta de inibidores BRAF ou MEK com imunoterapia..... | 46 |
| 11. | Conclusões e perspectivas futuras | 47 |
| 12. | Referências bibliográficas..... | 49 |

Índice de Figuras:

| | |
|---|----|
| 1. Representação dos estadios do melanoma..... | 13 |
| 2. Critérios ABCDE para deteção do cancro de pele..... | 18 |
| 3. Terapêuticas sistémicas utilizadas no melanoma em estadio IV..... | 20 |
| 4. Representação da estratégia MDEPT | 25 |
| 5. Mecanismos de resistência a fármacos citotóxicos no melanoma | 27 |
| 6. Mecanismo de efluxo de fármacos mediado por transportadores ABC..... | 28 |
| 7. Esquematização da via apoptótica | 31 |
| 8. Inibição dos linfócitos T mediada pelo CTLA-4 | 37 |
| 9. Inibição dos linfócitos T mediada pelo PD-1..... | 39 |
| 10. Mecanismo de ação do CTLA-4 e do PD-1..... | 40 |
| 11. Esquematização da via MAPK..... | 44 |

Índice de Tabelas:

| | |
|---|----|
| 1. Dados e indicadores de mortalidade referentes ao melanoma (Portugal, 2017).. | 15 |
|---|----|

Índice de Esquemas:

| | |
|--|----|
| 1. Mecanismos de ativação da DTIC e do TMZ | 23 |
| 2. Mecanismo de ativação de fármacos derivados do triazeno desencadeado pela tirosinase | 26 |

1. Introdução

Tanto a incidência do melanoma com a dos outros tipos de cancro de pele continua a aumentar, sendo o melanoma o tipo de cancro de pele responsável pelo maior número de mortes. Em média, a cada hora, morre uma pessoa com melanoma, tornando-se imperativo a redução dos fatores de risco e a detecção da doença nos estádios iniciais. Um diagnóstico detalhado é extremamente importante pois permite estabelecer o estadio do tumor e, no caso do melanoma é fundamental a realização de testes mutacionais (1–3).

Antes de 2010, as terapêuticas existentes para o melanoma metastático eram pouco efetivas. O diagnóstico desta patologia encontrava-se associado a um mau prognóstico, com uma sobrevivência global de 6 a 9 meses e menos de 20% de sobrevivência a 2 anos. A quimioterapia paliativa, com utilização da dacarbazina, constituiu o tratamento padrão do melanoma em estadio avançado durante várias décadas. No entanto, demonstrou-se que a taxa de resposta à quimioterapia era apenas de 15%, sem apresentar melhorias na taxa de sobrevivência dos indivíduos (4).

A dacarbazina foi o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento do melanoma, em 1974, seguida do interferão- α (INF- α), da interleucina-2 (IL-2) e do Ontak em 1990. Entre 2011 e 2015, foram aprovadas 10 novas terapêuticas, incluindo inibidores seletivos, anticorpos e terapêuticas direcionadas combinadas, o que levou a uma alteração no paradigma do tratamento do melanoma metastático através do desenvolvimento de terapêuticas extremamente efetivas (2,4).

2. Melanoma metastático

Existem três tipos de cancro da pele: carcinoma baso-celular, carcinoma espino-celular e o melanoma (5). O melanoma representa apenas 5% de todos os tipos de cancro de pele, no entanto, é o responsável pelo maior número de mortes (6). Desenvolve-se através da transformação maligna dos melanócitos (7). Estes contêm uma elevada concentração de melanina, responsável pela pigmentação natural da pele, cabelo, olhos e algumas áreas do sistema nervoso. Os melanócitos encontram-se na camada basal da epiderme e nos folículos capilares e bloqueiam a exposição elevada

aos raios ultravioleta (UV). Assim, reduzem a sua penetração prejudicial, encontrando-se também noutros locais, como no cérebro e nos olhos. Diversas mutações nos genes reguladores dos melanócitos alteram o seu fenótipo, comprometendo a regulação do crescimento celular pelos queratinócitos, podendo dar origem ao melanoma (8).

A homeostase dos melanócitos é regulada por células como, por exemplo, os queratinócitos, que estimulam a produção de melanina (8). Em resposta à radiação UV que causa dano no ADN, os queratinócitos da pele produzem a hormona estimuladora dos melanócitos (MSH) que se liga aos recetores da melanocortina (MC1R), localizados nos melanócitos. Por sua vez, os melanócitos, produzem e libertam melanina que funciona como um escudo da radiação UV, prevenindo futuras alterações no ADN (9).

O melanoma cutâneo pode, geralmente, ser classificado na população caucasiana pela sua origem em diferentes locais da pele (consoante a exposição solar cumulativa ou intermitente), pelo grau de exposição cumulativa aos raios UV, pela idade de diagnóstico, tipos de transportadores oncogénicos e carga mutacional. O melanoma cutâneo resultante da exposição solar crónica, aparece usualmente em indivíduos com idade mais avançada (>55 anos), nas áreas de exposição crónica, como a cabeça e o pescoço. O aparecimento de melanoma nestas áreas está associado a uma elevada carga mutacional relacionada com a exposição crónica, apresentando mutações nos genes BRAF, NF1 e NRAS. Por outro lado, o melanoma cutâneo associado à exposição solar intermitente, surge em indivíduos mais jovens (<55 anos), em áreas menos expostas ao sol, como o tronco e as extremidades proximais, e está frequentemente associados ao gene BRAFV600E, contendo uma carga mutacional menor (9).

As mutações oncogénicas mais comuns ocorrem nos genes BRAF (mais de 50%), NRAS (20%) e NF1 (cerca de 14%). Estas mutações servem como modelo para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direccionadas para os oncogenes mencionados anteriormente (10).

O melanoma é um dos tipos de tumor com mais alterações genéticas, no entanto, o número de mutações por célula de melanoma é altamente variável entre os doentes. Nem todos os melanomas estão associados ao dano no ADN induzido pela exposição solar crónica ou intermitente, uma vez que este pode desenvolver-se em áreas da pele

não expostas ao sol e ainda em órgãos internos. Além disso, as mutações na via MAPK, que é atualmente a via com maior relevância oncogénica e terapêutica no melanoma, não são consideradas como danos diretos da exposição solar. No entanto, os melanomas que surgem na cabeça, no pescoço ou nos membros superiores estão associados a elevadas taxas de alterações genéticas, enquanto que os que surgem no tronco ou nas extremidades inferiores apresentam taxas intermédias e os melanomas que surgem nas superfícies acral, mucosa ou uveal apresentam menores taxas de mutação (11,12).

Quanto às características clínicas e histológicas, o melanoma pode ser dividido em três subtipos: superficial extensivo, nodular e lentigo maligna. O melanoma superficial extensivo é o tipo mais comum, correspondendo a cerca de 70% dos casos. Surge em associação à exposição solar intermitente, localizando-se na parte posterior das pernas, nas mulheres, e nas costas, nos homens. Por sua vez, o melanoma nodular corresponde a cerca de 5% dos casos e aparece mais frequentemente no tronco e nos membros, entre os 50 e os 60 anos, sendo mais comum nos homens do que nas mulheres. Este apresenta, muitas vezes, ulceração, não tendo fase de crescimento radial, mas sim crescimento vertical, o que está associado a um crescimento mais rápido e a uma maior probabilidade de metastização. O melanoma lentigo maligna, entre 4 a 15% dos casos, relaciona-se com a exposição solar de longo termo e com o avançar da idade, podendo evoluir durante décadas antes de invadir a derme papilar. Localiza-se principalmente no pescoço e na cabeça. Existem outros subtipos de melanoma raros, como o melanoma acral lentiginoso e o desmoplásico. O subtipo acral lentiginoso é o menos comum na população caucasiana (5%), mas é o mais comum em pacientes asiáticos, hispânicos e africanos, afetando sobretudo doentes idosos e do sexo feminino. Localiza-se na pele glabra, região palmoplantar e subungueal. O melanoma desmoplásico surge em indivíduos entre os 60 e os 70 anos, principalmente no sexo masculino, sobretudo na cabeça e pescoço, mas pode surgir em diversas áreas cutâneas ou mucosas. Está associado a elevadas taxas de recorrência devido ao crescimento infiltrativo e invasão perineural frequentes. Apesar da elevada recorrência local, raramente apresenta metastização nos nódulos linfáticos, contudo apresenta tendência para metastizar os pulmões (13).

A progressão do melanoma pode ser dividida em 5 estádios (Figura 1). No estadio 0, correspondente ao melanoma *in situ*, o melanoma localiza-se no nevo, restringido à

camada epidérmica e com mínima interação com a corrente sanguínea. A maioria dos nevos cutâneos são benignos e não apresenta transformação celular. No entanto, os melanócitos transformados podem progredir para o estadio I. Este corresponde à fase de crescimento radial, causando lesões intra-epidérmicas e invasão de células tumorais menores. O estadio II é caracterizado pelo crescimento vertical, com invasão celular na derme vascularizada, associada ao aumento de risco de metastização. Nos estadios enumerados anteriormente, o melanoma primário pode ser removido por excisão cirúrgica radial, com elevada taxa de controle e prevenção da metastização. No estadio III, as células do melanoma invadem os nódulos linfáticos regionais, formando metástases locais e, no estadio IV, já são detetadas metástases à distância (8).

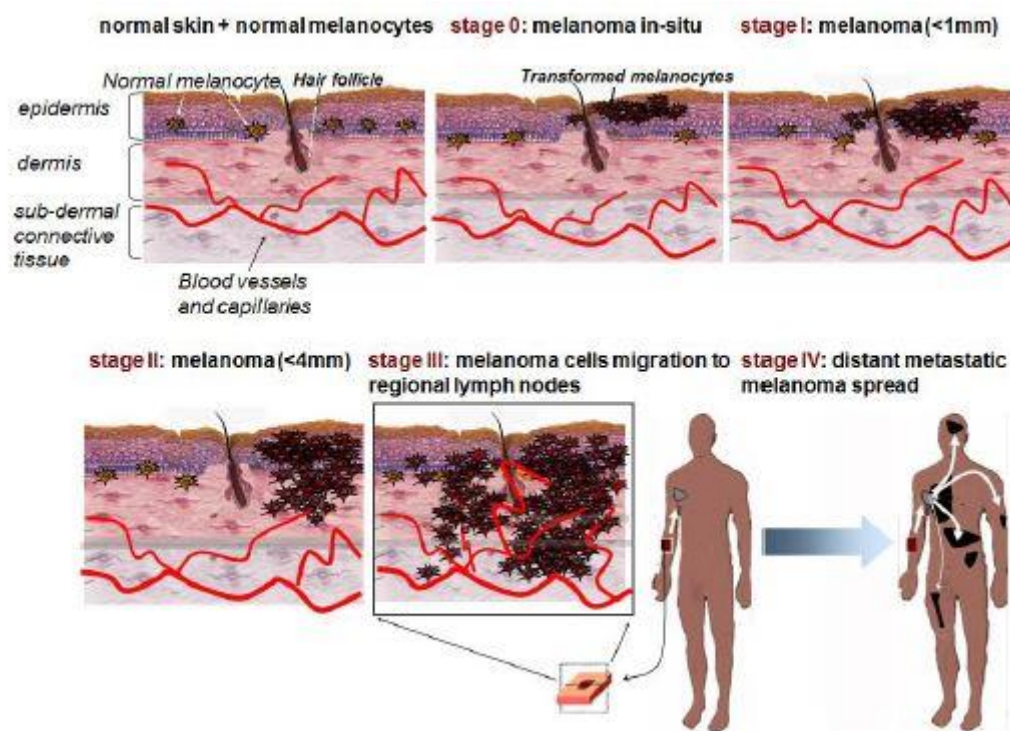


Figura 1- Representação dos estadios de melanoma (8)

Segundo a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), a classificação dos estadios do melanoma é feita com base em algumas características histopatológicas que incorporam os critérios TNM. Neste sistema, o T diz respeito à espessura do tumor primário, presença de ulceração e à taxa mitótica, o N relaciona-se com a

disseminação de metástases nos nódulos linfáticos regionais (face ao tumor primário) e o M relaciona-se com a localização das metástases à distância (face ao tumor primário) e com os níveis séricos da enzima lactato desidrogenase (LDH), uma vez que os níveis elevados desta enzima são considerados um fator de mau prognóstico (14,15).

O melanoma metastático à distância está associado a uma taxa de sobrevivência de apenas 5 a 10% dos casos em 5 anos e a uma sobrevivência global média entre 6 a 10 meses, dependendo do local das metástases. O melanoma pode metastizar qualquer órgão ou tecido sendo que os órgãos mais afetados são, por ordem decrescente de aparecimento de metástases, o pulmão, o fígado, o cérebro, os ossos e os intestinos. Foram identificados alguns fatores que predizem a sobrevivência dos doentes com melanoma metastizado, nomeadamente, possibilidade de ressecção cirúrgica, resposta à quimioterapia, nível sérico de LDH, local de desenvolvimento da primeira metástase e duração da remissão. Com base no local de desenvolvimento das metástases, a AJCC definiu 3 grupos de doentes com diferentes prognósticos: doentes com metástases na pele, tecido subcutâneo e nos gânglios linfáticos distantes apresentaram uma sobrevivência média de 18 meses; doentes com metástases pulmonares apresentaram sobrevivência média de 12 meses e doentes com metástases noutros órgãos que não o pulmão tinham sobrevivência média de 7 meses (16).

O fator de prognóstico mais importante do melanoma cutâneo primário é a espessura tumoral de Breslow. Esta é uma medida de invasão do tumor na derme e na derme subcutânea. Atualmente, nos países desenvolvidos, a maioria dos melanomas cutâneos são diagnosticados com uma espessura < 1mm (melanoma fino), sendo a percentagem de tumores que, posteriormente, metastizam de 10 a 15% (11).

3. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente, surgem cerca de 132.000 casos de melanoma cutâneo em todo o mundo (17).

A incidência do melanoma cutâneo tem vindo a aumentar anualmente de forma mais rápida comparando com outros tipos de neoplasias e varia de acordo com o fenótipo racial e com as diferentes exposições solares. O melanoma, ao contrário de outras neoplasias, afeta principalmente indivíduos jovens e de média idade, sendo os 57 anos

a média das idades de diagnóstico. A incidência da patologia aumenta linearmente entre os 25 e os 50 anos e decresce após esta faixa etária, particularmente no sexo feminino. Analisando a incidência em relação ao género, no sexo feminino, este é mais frequente na idade jovem, enquanto que, nos homens, prevalece a partir dos 55 anos (9).

Em 2015, as maiores taxas de incidência do melanoma foram identificadas na Austrália e na Nova Zelândia (60 casos em cada 100.000 diagnosticados por ano), seguindo-se os Estados Unidos da América (30 por 100.000 por ano) e depois a Escandinávia (20 por 100.000 por ano). Relativamente à Austrália, o número aumentado de casos pode ser explicado pelo facto da população apresentar maioritariamente pele clara e estar exposta a níveis elevados de radiação UV (11,18).

Segundo o *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*, foi estimado que, nos Estados Unidos, 2,3% dos homens e das mulheres seriam diagnosticados com melanoma cutâneo entre 2013 e 2015. Em 2018, foram diagnosticados 91 270 novos casos de melanoma cutâneo, responsável por 9 230 mortes nesse mesmo ano (19).

Nos Estados Unidos, o melanoma é o quinto tipo de neoplasia mais prevalente nos homens e o sexto nas mulheres. Prevê-se que 1 em cada 63 americanos desenvolverão melanoma ao longo da sua vida. Na Europa, existe um gradiente nas taxas de incidência, sendo estas mais elevadas nos países do Norte e mais baixas no Sul. Isto pode explicar-se não só devido à proteção aumentada contra os raios UV observada na população do Sul da Europa, uma vez que tem a pele mais pigmentada, mas também pelo diferente padrão da exposição solar crónica e não intermitente nos países do Sul da Europa (13).

Em Portugal, segundo o *Instituto Nacional de Estatística* (INE), em 2017, registaram-se 266 mortes devido ao melanoma cutâneo, representando 0,2% da mortalidade do país, atingindo mais os homens (0,3% do total de óbitos dos homens) do que as mulheres (0,2%). Por idade, cerca de 65% das mortes foram de pessoas com mais de 65 anos, e cerca de 42%, em pessoas com 75 e mais anos, sendo a idade média da morte por melanoma cutâneo de 69,8 anos (20).

| Dados e indicadores de mortalidade, Total, 2017 | | | |
|--|-----------|----------|----------|
| Causa de morte: Tumor maligno da pele (CID-10: C43) | HM | H | M |
| Total de óbitos (Nº) | 266 | 140 | 126 |
| Idade média à morte (Nº anos) | 69,8 | 67,9 | 72,0 |
| Proporção de óbitos pela causa de morte (% em relação ao total de óbitos) | 0,2 | 0,3 | 0,2 |
| Óbitos (N.º) com menos de 65 anos | 93 | 58 | 35 |
| Óbitos (N.º) com 65 e mais anos | 173 | 82 | 91 |
| Óbitos (N.º) com menos de 70 anos | 124 | 73 | 51 |
| Óbitos (N.º) com 75 e mais anos | 113 | 52 | 61 |
| Taxas padronizadas por todas as idades (por 100 000 habitantes) | 1,6 | 2,0 | 1,3 |
| Taxas padronizadas com menos de 65 anos (por 100 000 habitantes) | 0,9 | 1,2 | 0,7 |
| Taxas padronizadas com 65 e mais anos (por 100 000 habitantes) | 7,2 | 8,4 | 6,4 |
| Taxas brutas de mortalidade (por 100 000 habitantes) | 2,6 | 2,9 | 2,3 |
| Anos potenciais de vida perdidos (Nº) | 1 680 | 973 | 708 |
| Taxa de anos potenciais de vida perdidos (por 100 000 habitantes) | 19,3 | 22,9 | 15,8 |
| Número médio de anos potenciais de vida perdidos (Nº) | 13,5 | 13,3 | 13,9 |
| Taxas de anos potenciais de vida perdidos padronizadas (por 100 000 habitantes) | 16,5 | 19,8 | 13,6 |
| Nota: Os resultados estatísticos relativos a 2017 foram obtidos com base na informação do Sistema de Informação dos Certificados de Óbito disponível até 5 de dezembro de 2018. | | | |

Tabela 1- Dados e indicadores de mortalidade referentes ao melanoma (Portugal, 2017) (20)

4. Fatores de risco

Atualmente, o melanoma é considerado uma doença multifatorial que decorre de uma interação entre a suscetibilidade genética e exposição ambiental (13).

A radiação UV é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma uma vez que provoca alterações no ADN das células da pele, sendo a luz solar a maior fonte de raios UV (21).

A exposição intensa e intermitente, característica das queimaduras solares, está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de melanoma enquanto que a exposição contínua à radiação UV relaciona-se com outros tipos de cancro da pele que não o melanoma. A exposição à radiação UV através de fontes artificiais como, por exemplo, cabines de solário ou fototerapia em doentes com psoríase, é também um fator de aumento de risco (9).

Além disso, os fatores de risco inerentes ao hospedeiro, como pele clara, cabelo e olhos claros, sensibilidade à radiação solar, tendência para o aparecimento de sardas, história familiar de melanoma (10% dos casos de melanoma estão associados a história familiar), número de nevos melanocíticos congênitos e adquiridos (nevos displásicos e aumento do número de nevos típicos), a suscetibilidade genética e a imunossupressão, constituem um papel fundamental no desenvolvimento do melanoma. Neste sentido, além do número total de nevos, também o tamanho e o tipo estão associados ao risco (9,21,22)

Os nevos displásicos são semelhantes aos nevos típicos mas também apresentam algumas características do melanoma. Normalmente são maiores do que os outros nevos e apresentam uma cor ou forma anormal. Frequentemente, os nevos displásicos possuem carácter hereditário e apenas uma pequena percentagem destes evoluem para melanoma. O síndrome do nevo displásico, também denominado de FAMMM (*Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*), é característico de pessoas que apresentam muitos nevos displásicos e, pelo menos, um dos seus familiares próximos teve melanoma, pelo que as pessoas com este síndrome apresentam um risco muito aumentado de desenvolvimento de melanoma (21).

5. Diagnóstico

Analisando os dados epidemiológicos alarmantes referentes ao melanoma, torna-se necessário aumentar as práticas de diagnóstico que permitam a deteção precoce desta patologia, uma vez que a prevenção e a deteção precoce podem ter um impacto bastante positivo na redução da incidência da doença e também da mortalidade (23).

Em indivíduos com história pessoal ou familiar de melanoma ou em indivíduos com vários nevos com elevado risco de desenvolver melanoma, o seguimento periódico por um dermatologista consiste numa estratégia fundamental para o diagnóstico precoce, melhorando, consequentemente, a sobrevivência dos doentes (24).

Antes dos anos 80, o diagnóstico do melanoma era frequentemente realizado com base em características macroscópicas como a ulceração e a hemorragia. No entanto, com o decorrer do tempo, observou-se que estas características encontravam-se maioritariamente relacionadas com lesões avançadas e não deviam ser consideradas para o estabelecimento de um diagnóstico precoce (25).

De entre as medidas de prevenção secundária, a deteção precoce do melanoma é uma das principais causas de melhoria da sobrevivência na população de risco. Muitas vezes o problema estabelece-se na dificuldade da distinção entre uma lesão benigna e uma lesão maligna pois a probabilidade de, por exemplo, uma pequena mancha preta entre numerosas manchas nas costas de um paciente corresponder a um caso de melanoma é extremamente baixa (aproximadamente 1 em 2 milhões de casos). Uma forma de diferenciar as duas lesões é através da realização de uma análise patológica, recorrendo-se à realização de uma biópsia. No entanto, este método não é viável em indivíduos com múltiplos nevos uma vez que implicaria múltiplas excisões. Neste sentido, é importante o conhecimento e o estabelecimento das características dos estadios iniciais do melanoma que permitam uma deteção precoce do mesmo de modo a evitar a excisão desnecessária de sinais benignos (24).

A regra ABCD (assimetria, bordos irregulares, diversidade na coloração, diâmetro superior a 6 mm) foi criada em 1985 no sentido de educar os profissionais de saúde e a população para a deteção do melanoma em estadios iniciais através da distinção entre um nevo normal e um melanoma. Em 2004, ocorreu a junção da letra E à mnemónica referente à evolução (Figura 2). A sensibilidade e a especificidade do critério ABCD(E) varia consoante seja usado individualmente ou em conjunto com outros critérios (25).

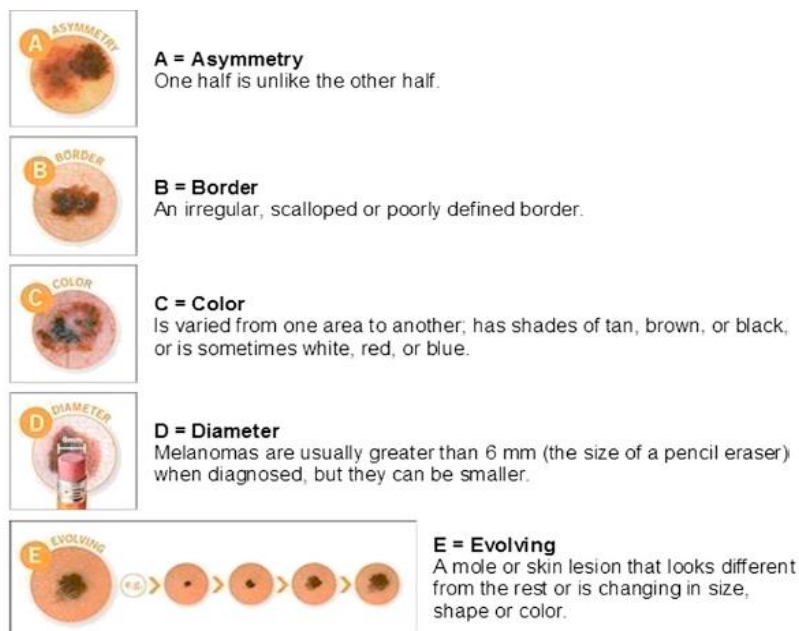


Figura 2- Critério ABCDE para deteção do cancro de pele (25)

Relativamente ao melanoma, 40 a 47% dos casos são auto detetados pelos doentes. Neste sentido, tem surgido uma necessidade crescente de educar a população sobre a deteção precoce de cancro cutâneo, estando o critério ABCDE incluído nessa educação (25). No entanto, o critério ABCDE não pode ser aplicado na análise de lesões com padrões de pigmentação atípica ou em lesões que surgem em certos locais específicos (24).

A dermatoscopia consiste numa técnica de diagnóstico não invasiva baseada na microscopia da superfície da pele que permite a visualização melhorada das estruturas internas das lesões sob o estrato córneo (24). Esta técnica permite a observação *in vivo* das estruturas da pele desde epiderme até à derme papilar através da ampliação e iluminação destas estruturas (26).

Esta técnica aumenta a precisão no diagnóstico do melanoma, através do exame clínico de lesões pigmentadas e não pigmentadas, permitindo diminuir a taxa de excisões desnecessárias de lesões benignas. Assim, a dermatoscopia tornou-se numa ferramenta fundamental no diagnóstico precoce do melanoma, sendo essencial nas lesões difíceis de diagnosticar para o estabelecimento de um diagnóstico diferencial (24,26)

6. Terapêuticas sistémicas no tratamento do melanoma

Historicamente, o prognóstico para indivíduos com melanoma em estadio avançado tem sido extremamente mau. Enquanto que a ressecção cirúrgica constitui a base do tratamento curativo para melanomas detetados precocemente, no caso de melanomas metastáticos (localmente ou à distância), a cirurgia desempenha um papel mínimo no seu tratamento (27).

As terapêuticas sistémicas incluem a quimioterapia, radioterapia e imunoterapia. No entanto, estas opções demonstraram eficácia a longo-termo em apenas 15 a 35% dos doentes, apresentando toxicidade moderada a significativa e efeitos adversos. O melanoma metastático é incurável na maioria dos doentes devido às resistências à maioria das terapêuticas sistémicas (28).

De acordo com a *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE), existem 3 abordagens sistêmicas para pacientes com melanoma em estadio IV, tal como pode ser observado na Figura 3 (quimioterapia, imunoterapia e terapêutica direcionada para o gene BRAFV600 positivo) (29).

Nos últimos anos, a abordagem do melanoma evoluiu rapidamente com a introdução de novas terapêuticas sistêmicas que permitem o controlo de estadios avançados da doença (27).

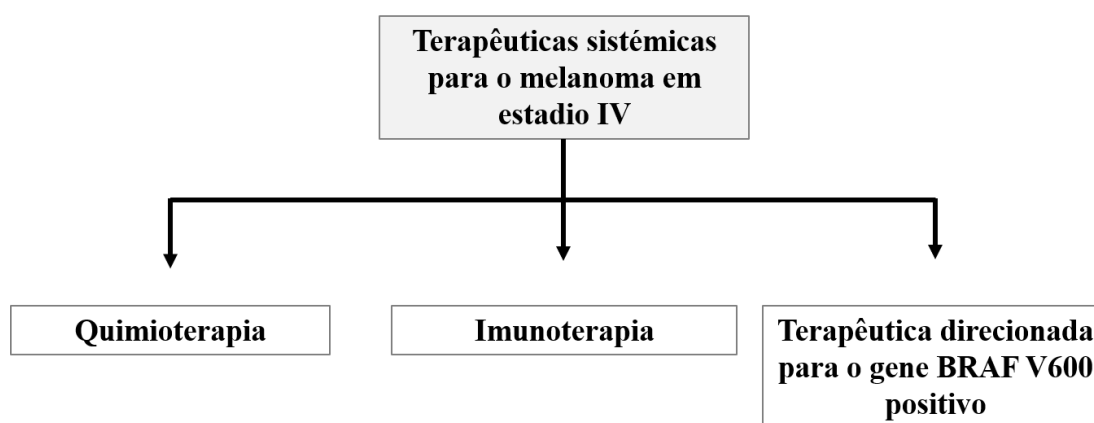


Figura 3- Terapêuticas sistêmicas utilizadas no melanoma em estadio IV

(Adaptado de (29))

7. Materiais e métodos

A pesquisa de informação para a realização da presente monografia baseou-se integralmente em recursos eletrônicos. Inicialmente, procedeu-se a uma pesquisa generalizada de artigos de revisão na base de dados PubMed, pertencente ao *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), utilizando as seguintes palavras-chave: “skin cancer”, “melanoma”, “melanoma metastatic,”, “resistance to chemotherapy”, “immunotherapy”, “target therapy”, “BRAF mutation”. A maioria dos artigos consultados no PubMed estão publicados em jornais dedicados à área da oncologia como, por exemplo: o *European Journal of Surgical Oncology*, o *The Cancer*

Journal, o *Annals of Oncology*, o *International Journal of Oncology* e o *Oncology Reviews*. Além destas, foram consultadas outras fontes consideradas essenciais para a elaboração da presente monografia, tais como o *National Cancer Institute*, a *American Joint Committee on Cancer*, o *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*, a Organização Mundial de Saúde e o Instituto Nacional de Estatística. Recorreu-se ainda à análise das *guidelines* atuais da *National Institute of Health and Care Excellence* (NICE) para o tratamento do melanoma metastático.

A partir da análise de diversos artigos selecionados, identificaram-se mais artigos considerados pertinentes, sendo que apenas foram incluídos artigos em língua inglesa. A maioria dos artigos selecionados e referenciados na presente monografia diz respeito a artigos publicados nos últimos cinco anos, no entanto, foram incluídos outros artigos com publicação anterior dada a sua relevância para o desenvolvimento do tema. Durante a pesquisa e seleção de informação, pretendeu-se utilizar a informação mais atualizada e fidedigna possível, publicada em revistas e jornais científicos.

8. Quimioterapia no tratamento do melanoma metastático

A quimioterapia baseia-se na inibição da divisão das células de crescimento rápido, como é o caso das células cancerígenas, mas também de outras células do organismo com taxas de proliferação celular elevadas como, por exemplo, as células da medula óssea, da pele, do trato gastrointestinal e dos folículos capilares. A principal razão para a toxicidade dos fármacos citotóxicos traduz-se pelo facto destes não serem específicos e terem como alvo todas as células com elevadas taxas de proliferação celular (30).

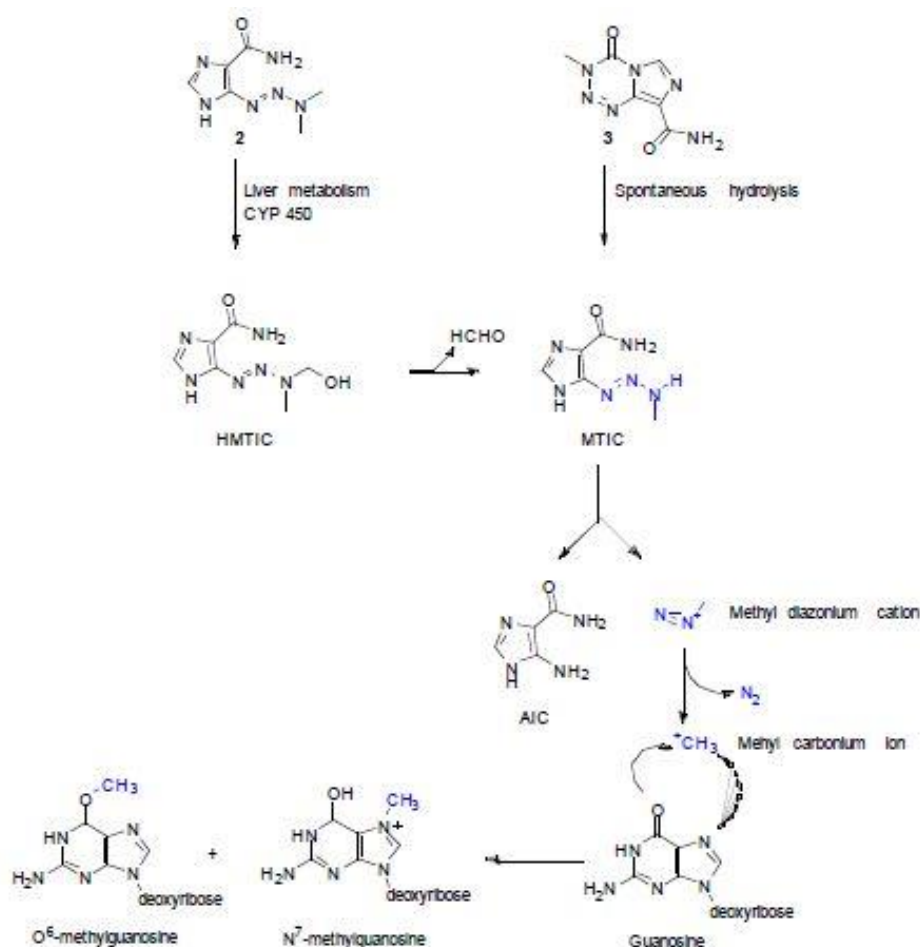
Durante bastantes anos, o tratamento de referência para doentes com melanoma em estadio inicial era a ressecção cirúrgica e para doentes com melanoma em estadio avançado era a quimioterapia combinada com elevadas doses de interleucina 2 (IL-2). Há cerca de 30 anos atrás, a dacarbazina (DTIC) foi aprovada pela FDA como o primeiro agente citotóxico para tratamento do melanoma e, juntamente com elevadas

doses de interleucina 2 (IL-2), era considerado o tratamento padrão para o melanoma em estadio avançado (30).

Os triazenos são moléculas de cadeia linear, contendo 3 átomos de nitrogénio adjacentes. São compostos com elevado potencial anticancerígeno e são utilizados em diversos tipos de tumores como leucemia, melanoma e tumores cerebrais. A sua ação consiste na formação de espécies alquildiazónicas que alquilam o ADN nas posições O6 e N7 da guanina. Os triazenos e os seus derivados com interesse clínico são a dacarbazina (DTIC) e o temozolomide (TMZ) (31).

A DTIC (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida), cuja estrutura química está representada pelo número 2 no Esquema 1, é um derivado imidazol-carboxamina, pertencente à classe dos triazenos e relaciona-se estruturalmente com as purinas. Este fármaco é usado no tratamento do melanoma, no sarcoma dos tecidos moles e na doença de Hodgkin desde 1970. Trata-se de um agente antineoplásico inespecífico do ciclo celular que funciona como agente alquilante após a sua ativação no seu composto ativo (31–33).

A DTIC é um pró fármaco que necessita de ativação através de metabolização, principalmente hepática, pelas isoformas do citocromo P450, dando origem a um composto hidroximetilado (HMTIC). Seguidamente, este composto perde o formaldeído, dando origem ao derivado monometílico (MTIC). Por sua vez, o MTIC tem um tempo de semivida curto e decompõe-se espontaneamente em 5-aminoimidazol-4-carboxamida e no catião metildiazónico, apresentado este último composto atividade alquilante (Esquema 1) (31).



Esquema 1- Mecanismo de ativação da DTIC e do TMZ (2- Dacarbazina, 3- Temozolmide) (31)

Este agente alquilante forma aductos de metil com as cadeias de ADN, ocorrendo 70% desta alquilação no N7 da guanina. Contudo, a citotoxicidade e os efeitos mutagénicos do metabolito ativo da DTIC manifestam-se maioritariamente através da alquilação no O6 da guanina, responsável por 6-8% das bases metiladas formadas. Estas alterações levam à formação de pares de bases incorretos, quebra nas cadeias duplas de ADN e, consequentemente, apoptose celular (34).

Este fármaco consiste na primeira escolha para a quimioterapia no melanoma em estadio avançado, não aumentando a sobrevivência dos doentes. A taxa de resposta varia entre 10 a 20% e a resposta é de curta duração, ocorrendo a recidiva do tumor 5

a 6 meses depois do início tratamento (28,30,35). A sua administração é feita por via intravenosa e os efeitos adversos mais comuns são emese, mielossupressão, toxicidade hepática e cardíaca, imunodepressão e toxicidade mucocutânea (31).

O temozolomide (TMZ) (8-carbamoyl-3-methylimidazol[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-ona), cuja estrutura pode ser observada no número 3 do Esquema 1, é um agente alquilante estrutural e funcionalmente análogo da DTIC. Consiste também num pró fármaco e converte-se no mesmo composto ativo que a DTIC (30,31).

Em contraste com a DTIC, o TMZ hidrolisa espontaneamente, originando o seu composto ativo, o MTIC, não sofrendo conversão enzimática (Esquema 1). Além disso, como este fármaco não necessita de ativação hepática, pode ser utilizado no caso de doentes com insuficiência hepática. Devido ao seu baixo peso molecular e ao seu carácter lipofílico, este fármaco consegue atravessar a barreira hematoencefálica, apresentando boa distribuição no sistema nervoso central, motivo pelo qual foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento de tumores cerebrais primário como o glioblastoma multiforme e o oligodendroglioma. Além disso, demonstrou eficácia no tratamento de metástases cerebrais do melanoma (30,31).

Ao contrário da DTIC, o TMZ pode ser administrado tanto por via parentérica como por via oral devido à sua boa absorção no trato gastrointestinal (100% de biodisponibilidade). Está ainda associado a uma menor incidência dos efeitos adversos, sendo o mais comum a mielossupressão (31).

Nas terapêuticas antineoplásicas, um dos objetivos que mais contribuiu para o desenvolvimento de pró fármacos foi o facto de se pretender terapêuticas mais precisas, cujos efeitos fossem direccionados para o local de ação, minimizando os efeitos adversos nos tecidos que não constituem o alvo do fármaco, ou seja, pretendia-se obter terapêuticas direccionadas para um determinado local. Esta estratégia pode ser obtida com a ativação do pró fármaco num tecido específico, resultado da metabolização por parte de uma enzima que é exclusiva daquele tecido ou apresenta expressão aumentada neste tecido quando comparada com outros (31).

O melanoma metastático continua a ser um dos cancros mais difíceis de tratar. Tem-se investigado a possibilidade de alguns compostos anti tumorais de triazenos serem aplicados numa terapêutica específica para o melanoma. Esta estratégia explora a única via enzimática da biossíntese de melanina para conversão no local do tumor de

pro fármacos não tóxicos em compostos ativos contra o melanoma.(36) A tirosinase é a enzima responsável pela síntese de melanina e é uma oxidase cuja função se traduz na conversão de monofenóis ou catecóis na correspondente *o*-quinona. Esta enzima encontra-se nos melanócitos e observa-se a expressão aumentada da mesma nas células do melanoma, surgindo a sua atividade relacionada com o grau de malignidade do melanoma (31).

Uma das propostas ainda em investigação é a estratégia denominada MDEPT (*melanocyte-directed enzyme prodrug therapy*). Esta abordagem baseia-se no aumento de seletividade na distribuição dos pró fármacos através da combinação de um agente citotóxico (um triazeno ou outro) ligado a um substrato da tirosinase (transportador) (Figura 4) (31).

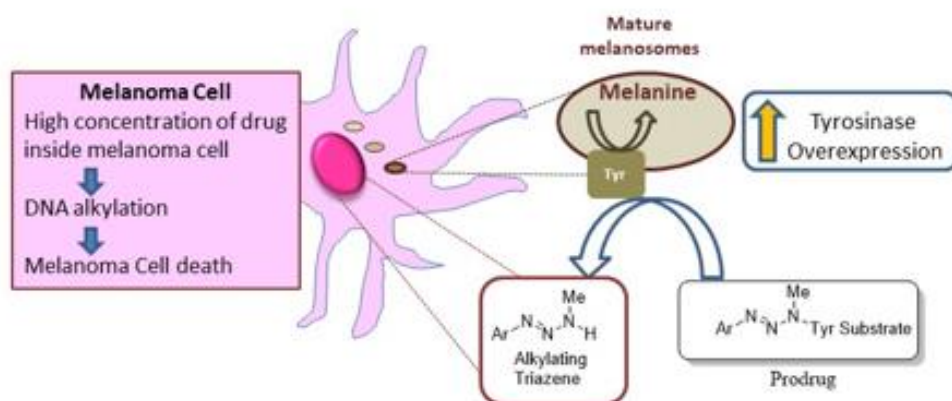
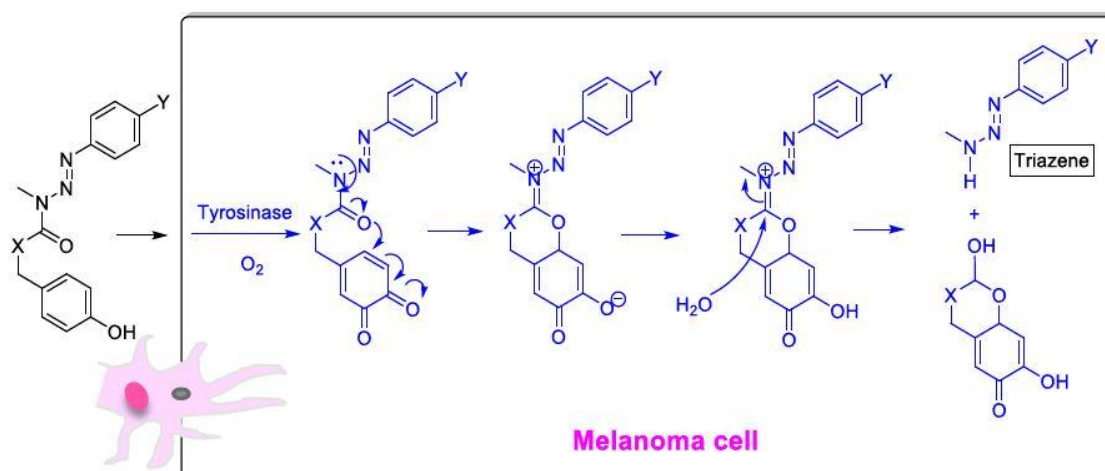


Figura 4- Representação da estratégia MDEPT (31)

Neste sentido, têm vindo a ser desenvolvidos novos derivados do triazeno com um ligante, por exemplo, amida entre o transportador, um substrato de tirosinase (dopamina ou tiramina) e a unidade citotóxica (triazeno), que será ativado pela tirosinase (Esquema 2). Este transportador, *N*-acetil-L-tirosina, constitui um bom substrato para a tirosinase. No sentido de aumentar a concentração no local do tumor e a falta de seletividade entre células tumorais e células normais, este composto foi

incorporado em lipossomas, o que permitiu potenciar a citotoxicidade do derivado do triazeno (31).



Esquema 2- Mecanismo de ativação de fármacos derivados do triazeno, desencadeado pela tirosinase (31)

9. Mecanismos de resistência à quimioterapia

No decorrer dos anos, a quimioterapia tem sido o tratamento de referência para os tumores metastáticos. No entanto, as células cancerígenas são caracterizadas pelo desenvolvimento frequente de mecanismos de resistência aos fármacos utilizados, sendo este um dos principais passos limitantes no tratamento dos doentes. Embora a maioria das terapêuticas existentes modifiquem o crescimento tumoral, em grande parte dos casos a resposta ao tratamento não é duradoura, tendo o insucesso terapêutico impacto na sobrevivência dos doentes com melanoma metastático (37)(38).

Existem diversos fatores que podem influenciar o aparecimento de resistência como, por exemplo:

- Baixa absorção, rápido metabolismo ou a excreção do fármaco, resultando em níveis séricos baixos;
- Tolerância reduzida aos fármacos, especialmente nos indivíduos idosos, o que leva à redução das doses abaixo dos níveis ótimos;

- Incapacidade para transportar o fármaco até ao local do tumor;
- Várias alterações no ambiente tumoral, como metabolização local do fármaco por células não tumorais afetando a resposta aos fármacos;
- Características invulgares do suprimento sanguíneo do tumor, podendo afetar o tempo de distribuição dos fármacos (31).

A resistência simultânea a fármacos estruturalmente diferentes pode não apresentar um mecanismo de ação comum, denominando-se por fenómeno de resistência a diversos fármacos (MDR) (37). Este fenómeno leva ao aumento do insucesso da quimioterapia e, conseqüentemente, observa-se uma necessidade crescente no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com baixa suscetibilidade a mecanismos comuns de resistência que tem como objetivo melhorar as taxas de resposta e aumentar a sobrevivência (7)(38).

O desenvolvimento da resistência aos fármacos, quer tenha origem intrínseca (resistência primária ou intrínseca) ou ocorra durante a exposição ao agente citotóxico (resistência adquirida), traduz-se num grande problema que limita a eficácia da terapêutica (7). A resistência adquirida pode resultar de diversos fatores como, por exemplo, através do aparecimento de mutações que levam a uma diminuição da ligação dos fármacos às células cancerígenas, pelo aumento da atividade do alvo terapêutico ou pela regulação positiva dos transportadores responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos (39).

No caso do melanoma metastático, a quimioterapia consiste numa terapêutica extremamente ineficaz e insatisfatória devido aos mecanismos de resistência aos fármacos utilizados, sendo esta resistência característica da doença (7).

A atividade dos fármacos citotóxicos consiste em causar danos no ADN, levando à apoptose celular. Frequentemente, no tratamento do melanoma, a quimioterapia não conduz à morte celular, no entanto, os mecanismos de resistência aos fármacos ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Têm sido propostas algumas explicações possíveis como, por exemplo, a interrupção da acumulação de fármacos causada por bombas de efluxo, a ativação de mecanismos de reparação do ADN regulados positivamente, a existência de defeitos na sinalização da apoptose e a ativação de fatores de sobrevivência, entre outras (28).

Embora seja possível desenvolver terapêuticas direcionadas para as resistências adquiridas, melhorando a eficácia dos fármacos, a heterogeneidade e a adaptabilidade das células cancerígenas levam a outras formas de resistência adquirida. Por conseguinte, torna-se importante perceber como se pode prever, prevenir e direcionar as terapêuticas de modo a melhorar as formas de tratamento do melanoma (39).

Os genes que afetam a sensibilidade aos fármacos citotóxicos estão envolvidos no transporte e metabolismo de fármacos, síntese e reparação de ADN, sobrevivência celular e apoptose. Esta relação entre a expressão genética e a sensibilidade à quimioterapia é bastante importante porque revela novos alvos terapêuticos e potencializa abordagens que podem reverter a resistência do tumor à quimioterapia (31).

Os mecanismos de resistência intrínseca aos fármacos nas células do melanoma são pouco conhecidos, no entanto, muitos dos mecanismos de resistência identificados para outros tipos de células, foram investigados para o melanoma. (Figura 5) (28).

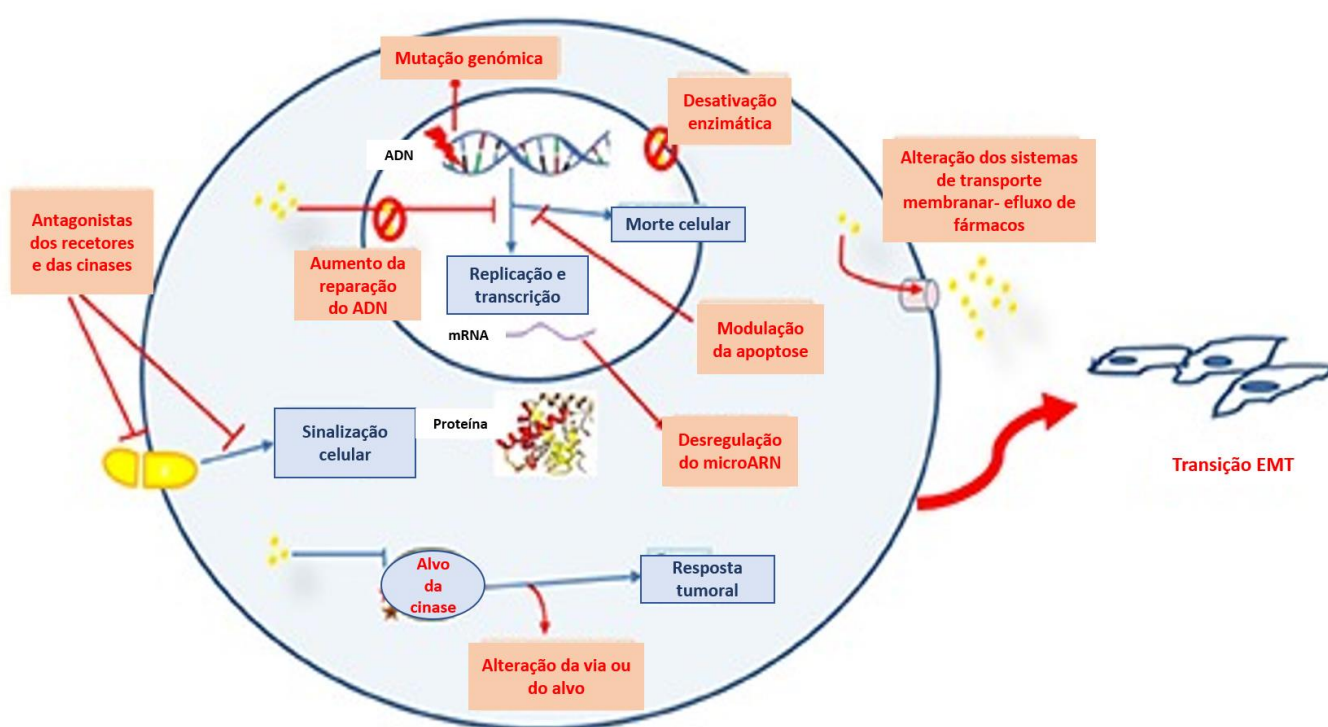


Figura 5 – Mecanismos de resistência aos fármacos citotóxicos no melanoma
(adaptado de (28))

9.1. Transporte de fármacos e resistência mediada por bombas de efluxo

A resistência a múltiplos fármacos constitui um problema clínico bastante relevante e, normalmente, observa-se o seu aparecimento durante ou após o tratamento com quimioterapia. O mecanismo de resistência a múltiplos fármacos mais comum é caracterizado pelo aumento da expressão de moléculas de transporte transmembranar pertencentes à família de transportadores ABC (ATP-binding cassette), dando origem a sistemas de efluxo de fármacos (40)(41). Estes sistemas são os mecanismos de resistência mais observados e são responsáveis pela redução da acumulação intracelular de fármacos citotóxicos. Os transportadores ABC são proteínas transmembranares que consistem em bombas moleculares que catalisam o transporte de substratos através de membranas biológicas, contra o gradiente de concentração, como consequência da hidrólise de ATP, resultando no transporte ativo de fármacos para o exterior das células. A sua estrutura consiste em dois domínios transmembranares hidrofóbicos (TMDs), que formam um poro na membrana, criando um ambiente de ligação ao substrato ligado a dois domínios de ligação a nucleótidos hidrofílicos (NBDs), localizados no citosol (Figura 6) (38,42).

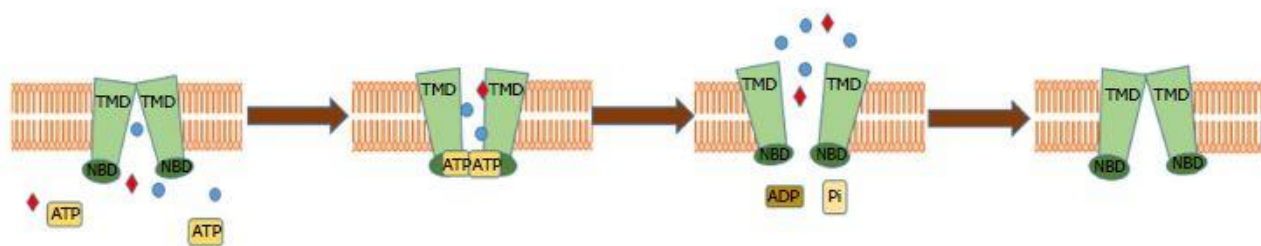


Figura 6 – Mecanismos de efluxo de fármacos mediado por transportadores ABC

(42)

Existem duas classes de proteínas transportadoras de fármacos dependentes de ATP, nomeadamente a glicoproteína P (Pgp) e as proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (MRPs), mediando ambas o efluxo do fármaco para o exterior das células (7). A Pgp tem a capacidade de se ligar a inúmeros fármacos hidrofóbicos, incluindo fármacos citotóxicos como o TMZ (31).

O genoma humano codifica 48 genes de transportadores ABC categorizados em sete subfamílias, organizadas de ABCA a ABCG. Estes transportadores são classificados com base na sequência e organização dos domínios de ligação ao ATP, que contêm motivos específicos (Walker A e Walker B) presentes em todas as proteínas de ligação ao ATP (43). O primeiro transportador desta família identificado foi o ABCB1, uma glicoproteína pertencente à membrana citoplasmática também conhecido como glicoproteína P, P170 ou MDR1/Pgp (40).

Entre os transportadores ABC conhecidos, as células do melanoma expressam os mais estudados e direcionados para a resistência aos fármacos, como o ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCA9, ABCB5, ABCB8, ABCD1 E ABCG2 (7).

A glicoproteína P é a bomba de efluxo de fármacos responsável pelo maior número de resistência a múltiplos fármacos nas células tumorais, no entanto, o seu papel no desenvolvimento de resistência nas células do melanoma é reduzido, uma vez que a sua presença não é detetável na maioria dos melanomas primários e metastizados. Apesar disso, podem estar presentes outros transportadores de fármacos que levam ao aparecimento de resistência no melanoma (28).

Foi isolada uma subpopulação de células com sistema de efluxo diretamente de doentes com melanoma. Estas células demonstraram ter uma capacidade de efluxo aumentada e apresentavam resistência ao paclitaxel mediada por sobreexpressão ABCB1 e ABCB5. Contudo, a maioria das linhagens celulares de melanoma, assim como os tumores primários e metastizados não expressam Pgp e, por isso, não podem ser consideradas como uma característica importante que medeia a resistência aos fármacos nas células do melanoma. Por outro lado, observa-se que as MRP são frequentemente expressas nas células do melanoma mas a sua expressão não altera significativamente a resposta à quimioterapia (7).

Apesar de ainda não terem sido estudados todos os transportadores de fármacos, atualmente considera-se que a ativação dos transportadores de fármacos pode não ser a causa principal da resistência à quimioterapia nos cancros cutâneos (7).

9.2. Resistência mediada por alteração da ativação enzimática

Considera-se que o reajuste da metabolização consiste num importante mecanismo de resistência aos fármacos citotóxicos. Alguns estudos recentes revelaram que a resposta à quimioterapia é extensamente influenciada pelo estado metabólico das células cancerígenas e, por outro lado, estas células reajustam a sua metabolização aos fármacos citotóxicos. (39).

A inativação dos fármacos pode diminuir a capacidade do fármaco livre para se ligar aos seus alvos intracelulares.

A destoxificação intracelular de agentes antineoplásicos, predominantemente agentes alquilantes, decorrente de um aumento do nível da glutatona (GSH), com consequente aumento da atividade da glutatona-S-transferase (GST) foi observada em várias linhagens de células tumorais (44). A GSH é um antioxidante bastante potente que inibe o stress oxidativo que pode danificar o ADN e o ARN. Observou-se que os níveis de GST eram mais elevados nas lesões do melanoma comparando com os níveis dos nevos melanocíticos benignos (7).

A conjugação dos fármacos antineoplásicos com a GSH inibe a conversão dos mono-aductos em cross-links, reduzindo, assim, o potencial citotóxico dos aductos. (7).

A topoisomerase é o alvo de diversos fármacos citotóxicos, como o etoposido. Esta é uma enzima nuclear que desempenha um papel fundamental na transcrição e recombinação do ADN e na segregação dos cromatídeos durante a mitose. No melanoma, a resistência ao etoposido está relacionada com uma mutação e com o aumento da atividade da topoisomerase II (7,44).

9.3. Resistência mediada pela modulação da via apoptótica

A maioria dos agentes antineoplásicos atuam através da indução da apoptose. A eficácia dos fármacos encontra-se reduzida no melanoma o que provavelmente se relaciona com uma resposta apoptótica reduzida em comparação com outros tipos de células. Além disso, demonstrou-se que as células do melanoma apresentam uma percentagem muito baixa de apoptose espontânea comparando com outros tipos de células malignas (44).

A apoptose consiste num processo genético complexo do qual fazem parte várias vias, representadas na Figura 7 encontrando-se, atualmente, caracterizadas duas cascatas de ativação das caspases que regulam a apoptose (31).

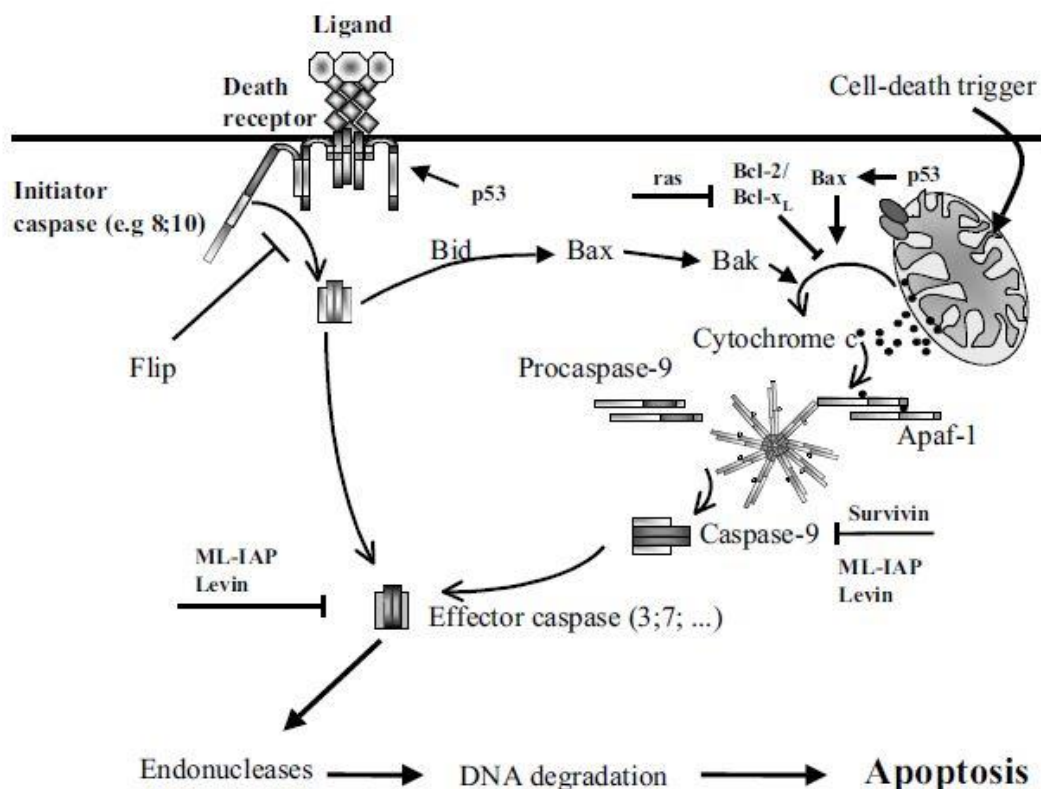


Figura 7 – Esquematização da via apoptótica (44)

A via extrínseca é desencadeada pela ligação dos ligandos aos recetores de morte individuais que se encontram na superfície celular (por exemplo, o CD95) e, após oligomerização, ocorre recrutamento de moléculas adaptadoras e caspases iniciadoras (caspases 8 e 10), resultando numa cascata proteolítica. A via intrínseca envolve a libertação mitocondrial do citocromo c que se liga ao fator ativador da protease apoptótica-1 (Apaf-1) e, conseqüentemente, induz alterações conformacionais dessa proteína apoptótica seguido do recrutamento da procaspase-9, sendo esta de seguida autocatalisada. Estas duas vias convergem através da ativação de caspases efetoras, da indução de endonucleases específicas que resulta na fragmentação do ADN e clivagem das proteínas nucleares essenciais para a estrutura nuclear e celular, da

reparação e da replicação do ADN. A morte ou a sobrevivência celular é determinada por moléculas reguladoras tais como p53, Ras, proteínas da família Bcl-2 e da família IAP (7).

A apoptose das células cancerígenas é ativada pela proteína de supressão tumoral p53, em resposta à quimioterapia. A proteína p53 não mutada promove a paragem do ciclo celular e apoptose em resposta ao dano no ADN causado pelos fármacos, através do controlo da regulação transcricional dos genes alvo, como o Bcl-2 e o Bax. A sobreexpressão da p53 não mutada e a mutação da mesma relacionam-se com o aumento do potencial metastático nas células de melanoma. Esta proteína sofre mutações em cerca de 50% dos casos, tornando-se não funcional, o que leva ao desenvolvimento de resistência aos fármacos citotóxicos (44,45).

Num estudo, observou-se que a resistência à cisplatina está associada à redução da atividade da caspase-9 e da libertação do citocromo c, paralelamente à fragmentação normal do DNA, enquanto que nas células de melanoma resistentes ao etoposido não é possível induzir apoptose celular. (44).

9.4. Resistência mediada por alteração na reparação do ADN

A maioria dos agentes citotóxicos utilizados no tratamento do melanoma são agentes alquilantes, sendo a dacarbazina e o temozolomide os mais comuns, induzindo lesões através da formação de aductos metil-ADN, denominados de O6-metilguanina, seguindo-se a formação de interligações cruzadas de ADN entre cadeias e, como consequência, ocorre inibição da replicação do ADN ou transcrição do ARN, levando à paragem do ciclo celular. No entanto, estas alterações no ADN podem ser revertidas por mais do que um mecanismo de reparação e, quando estes mecanismos ocorrem, as células tumorais tornam-se resistentes. A enzima de reparação do ADN, a O6-metilguanina-ADN metiltransferase (MGMT) é uma enzima desalquilante que auxilia na reparação dos aductos formados, diminuindo o efeito citotóxico dos fármacos utilizados, constituindo, assim, um potencial mecanismo de resistência aos fármacos. As células do melanoma resistentes aos fármacos apresentam, assim, uma reparação aumentada dos danos do ADN. Além disto, a diminuição da expressão da proteína de reparação da incompatibilidade nuclear (MMR), que induz a apoptose das células com

aductos O6-metilguanina, foi associada a um fenótipo de resistência nas células do melanoma resistentes aos fármacos (7)(28)(31).

A alquilpurina-ADN-N-glicosilase (APNG) é uma enzima de reparação de excisão de bases, expressa nas células do melanoma resistentes ao TMZ e a sua função consiste na reparação da N3-metiladenina e N7-metilguanina (31).

Outra enzima de reparação da excisão de bases envolvida na resistência ao TMZ é a polimerase poli-(ADP)-ribose (PARP), capaz de catalisar a transferência da ADP-ribose para as proteínas alvo. Esta enzima desempenha um papel importante em diversos processos celulares, incluindo a modulação da estrutura da cromatina, transcrição, replicação, recombinação e reparação do ADN. A PARP desempenha, assim, um papel importante na reparação do ADN uma vez que a sua inibição pode aumentar a citotoxicidade dos agentes alquilantes (31).

10. Abordagem de novos alvos terapêuticos no melanoma metastático

Nos últimos anos, o tratamento do melanoma metastático foi alvo de grandes avanços decorrentes de descobertas como a base molecular da heterogeneidade genética, a compreensão de que as respostas imunológicas endógenas desempenham um papel fundamental quer no reconhecimento quer na eliminação das células cancerígenas e a perceção dos mecanismos que impedem o sistema imunitário de eliminar as células tumorais (46).

O aumento do conhecimento sobre as alterações que ocorrem a nível molecular permitiu a identificação de novos alvos, o que por sua vez, levou ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Estes novos alvos terapêuticos permitiram uma alteração no paradigma comum da baixa sobrevivência dos doentes com melanoma metastático, uma vez que estas novas estratégias conduzem a uma nova realidade, obtendo-se elevadas taxas de resposta, controlo prolongado da doença, surgindo, ainda, em alguns casos, a possibilidade de cura (47).

Com o decorrer dos anos, têm surgido novos tratamentos, direccionados para mutações específicas ou bloqueando alguns *checkpoints* imunitários negativos, apresentando um

elevado impacto na sobrevivência global dos indivíduos com melanoma. As novas opções terapêuticas incluem terapêuticas direcionadas e também alternativas de imunoterapia. Por exemplo, fármacos direcionados para diferentes intervenientes da via MAPK, como o vemurafenib e dabrafenib, que são fármacos inibidores BRAF e fármacos inibidores MEK, como o cobimetinib, o trametinib e o binimetinib. Outras alternativas são os fármacos como o ipilimumab e o nivolumab que são inibidores imunológicos direcionados para o antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e para a proteína de morte programada-1 (PD-1), respetivamente (30).

Algumas terapias alternativas recorrem à utilização de vírus oncolíticos que induzem a destruição do tumor através do desenvolvimento de infeção e consequente lise das células cancerígenas ou por desencadear ruptura vascular aguda, levando à indução de imunidade tumoral (30).

De entre as alterações genéticas identificadas no melanoma, salientam-se as mutações BRAF que ocorrem em 50-60% dos casos de melanoma (a substituição V600E representa 90% das mutações BRAF, sendo as outras BRAFV600K ou outras mutações V600 raras), as mutações NRAS presentes em 20 a 30% dos casos (surtem mutuamente com as mutações BRAF), as mutações e/ou amplificação c-KIT (mais comuns no melanoma mucosal e acral). Estas mutações permitiram o desenvolvimento de novas perspectivas terapêuticas direcionadas para a via MAPK (hiperativada em 90% dos melanomas), através de inibidores BRAFV600E, MEK ou RTK (48)(49).

Em 2011, a FDA aprovou duas novas abordagens para o tratamento do melanoma metastático, nomeadamente, a terapêutica direcionada para a mutação BRAFV600E e a imunoterapia anti-CTLA-4. Desde então, a combinação de terapêutica direcionada com anticorpos anti-PD-1 e vários outros novos agentes foi aprovada, tendo resultados bastante positivos na sobrevivência dos doentes (27).

10.1. Imunoterapia

Os indivíduos com melanoma avançado apresentam uma resposta imunitária antitumoral comprometida, levando à tolerância imunológica do tumor e à criação de um microambiente tumoral propício à progressão da doença. A imunoterapia permite superar com sucesso a imunossupressão mediada por tumores, causando maior impacto no tratamento desta doença ao longo dos últimos anos (50).

Uma das primeiras abordagens com sucesso na área da imunoterapia foi o tratamento com doses elevadas de IL-2, sendo esta a primeira imunoterapia aprovada para o tratamento do melanoma. A taxa de resposta ao tratamento é baixa, variando entre 10 a 20%, à semelhança da quimioterapia. No entanto, consiste numa opção terapêutica benéfica pois, apesar de apresentar uma baixa taxa de resposta, nos doentes que respondem, esta prolonga-se entre 5 a 12 anos (51).

Uma das estratégias desenvolvidas no tratamento do melanoma foi a utilização de anticorpos monoclonais que bloqueiam *checkpoints* imunológicos, responsáveis pela mediação da resistência imunológica adaptativa. Assim, recentemente, foram aprovados pela FDA e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) três fármacos para o tratamento do melanoma metastático, sendo eles o ipilimumab, um fármaco anti-CTLA-4, o nivolumab, anti-PD1 e o pembrolizumab, direcionado para o CTLA-4 e para PD-1 (46).

10.1.1. Terapêutica anti-CTLA-4

O mecanismo molecular da imunoterapia baseia-se na interação entre o sistema imunitário e as moléculas presentes na superfície das células cancerígenas. A resposta imunitária contra neoplasias é mediada por linfócitos T, nomeadamente linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos, que funcionam como células efectoras primárias. No sentido de reagir contra qualquer célula estranha ao organismo, os linfócitos T naïve são ativados e a resposta citotóxica pode ser iniciada através de dois sinais: o primeiro sinal é mediado pelo recetor das células T (TCR), ligado a um antígeno específico pertencente ao complexo de histocompatibilidade (MHC), na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC) e o sinal secundário baseia-se na interação entre o recetor CD28, presente na superfície do linfócito T, e o CD80/86 (B7) na APC (52–54).

O CTLA-4 é um recetor transmembranar, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que é expresso na superfície dos linfócitos T ativados e regula a amplitude da ativação inicial das células T nos gânglios linfáticos. Constitui uma das duas proteínas homólogas expressas à superfície das células T que se contrabalançam e permitem a ativação e inibição das células T. Este recetor apresenta elevada afinidade para os ligandos CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em células apresentadoras de antígenos, competindo com o CD28 para a ligação a estes ligandos. Após a ligação

do CD80 (B7-1) e do CD86 (B7-2) ao CTLA-4, ocorre a regulação negativa da ativação das células T, uma vez que estas se tornam anérgicas, ou seja, não respondem a antígenos. Consequentemente, ocorre inibição da secreção da IL-2, impedindo a ativação e proliferação das células T (Figura 8) (55).

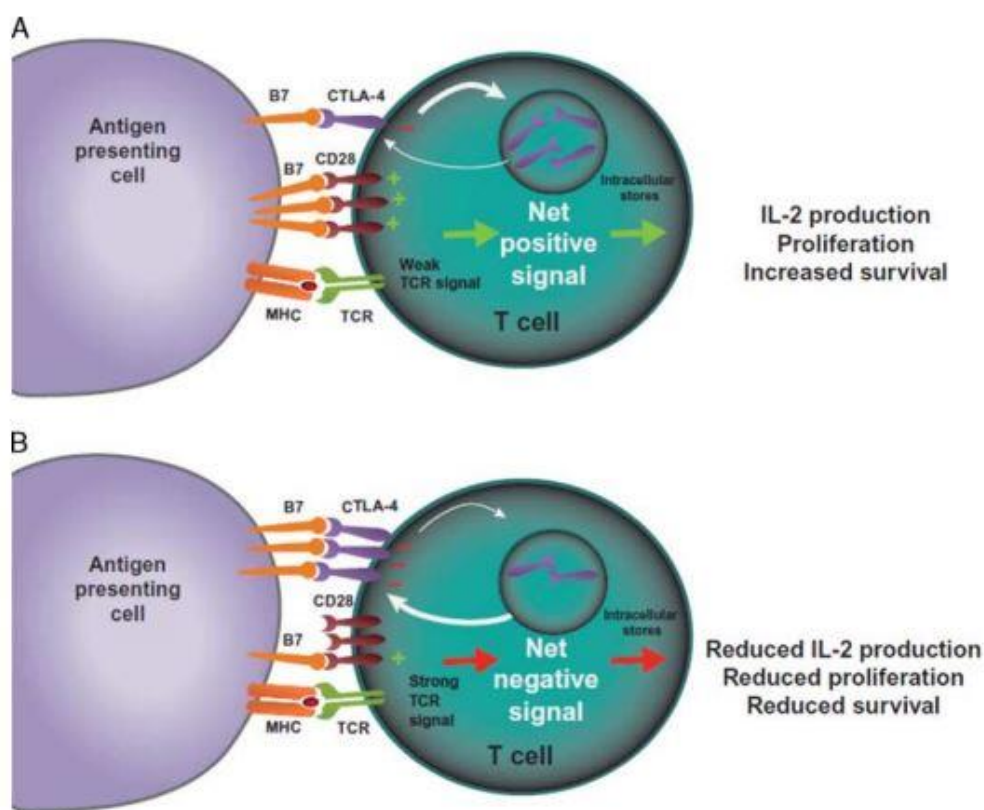


Figura 8 – Inibição dos linfócitos T mediada pelo CTLA-4 (54)

Foram testados dois anticorpos anti-CTLA-4 num ensaio clínico de fase III: o ipilimumab e o tremelimumab. No entanto, o tremelimumab não demonstrou benefícios na sobrevivência em comparação com a quimioterapia (55,56).

Cerca de 12 anos após a aprovação da IL-2 pela FDA, surgiam os primeiros resultados da utilização do ipilimumab em doentes pré-tratados diagnosticados com melanoma em estadios avançados, sendo o ipilimumab um anticorpo monoclonal que tem como alvo o CTLA-4 (57).

À semelhança da IL-2, demonstrou-se que a taxa de resposta ao ipilimumab em monoterapia é cerca de 10,9%, mas 60% dos doentes que respondem à terapêutica, apresentam controlo da doença durante aproximadamente 2 anos (57).

Num ensaio clínico de fase III, demonstrou-se que o tratamento concomitante com ipilimumab e dacarbazina em indivíduos com melanoma metastático conduz a um aumento na sobrevivência de 2 meses comparando com o tratamento com dacarbazina em monoterapia. No entanto, a terapêutica com a utilização dos dois fármacos conduz ao aumento da hepatotoxicidade (57).

Noutro ensaio clínico conduzido em doentes com melanoma em estadio III e IV comparou-se a terapêutica combinada de ipilimumab com DTIC vs DTIC com placebo. Os resultados demonstraram uma sobrevivência global significativamente mais prolongada no grupo não tratados previamente e que foram tratados com ipilimumab e dacarbazina (50).

O ipilimumab demonstrou benefícios de sobrevivência em indivíduos com melanoma metastático que nunca tinham sido submetidos a outros tratamentos. Além disso, o bloqueio dos CTLA-4 apresentou novos desafios de diagnóstico e manutenção da toxicidade imunomediada relacionada com o mecanismo de ação do ipilimumab, que pode levar a efeitos adversos graves que podem requerer tratamento com corticosteróides sistémicos e/ou outros imunossuppressores (50).

10.1.2. Terapêutica anti-PD-1

Atualmente, o foco da imunoterapia para o melanoma metastático está numa molécula denominada de proteína de morte celular programada (PD-1), um inibidor das proteínas dos recetores celulares, que impede a ativação dos linfócitos T e dos seus mecanismos efetores, inibindo consequentemente a resposta imunitária contra as células cancerígenas (57).

Em 2015, o nivolumab e o pembrolizumab, dois fármacos anti-PD-1, foram testados num ensaio clínico de fase III e aprovados pela EMA para o tratamento do melanoma irressecável e para o melanoma metastático. Ambos os fármacos são anticorpos monoclonais derivados da imunoglobulina G4 mas, enquanto o nivolumab é um anticorpo humano, o pembrolizumab é um anticorpo totalmente humanizado (55). O pembrolizumab e o nivolumab melhoram ainda mais as taxas de resposta até 40% e prolongam a sobrevivência dos doentes com melanoma (58).

Ao contrário do CTLA-4, que regula principalmente a ativação das células T nos gânglios linfáticos nos estadios iniciais de maturação, o PD-1 (também conhecido

como CD279) é um regulador negativo da atividade das células T nos tecidos periféricos e no microambiente tumoral. O nivolumab e o pembrolizumab ligam-se ao PD-1 e, consequentemente, inibem a interação deste recetor com os seus ligandos, o ligando de morte programada-1 (PD-L1) e o ligando de morte programada-2 (PD-L2). O PD-1 é expresso nos linfócitos infiltrantes de tumores (também denominados linfócitos T CD4+), nos linfócitos B, nos monócitos, nas células dendríticas e nas células NK (natural killers). O PD-L1 e o PD-L2 são predominantemente expressos nas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, mas também podem ser expressos nas células tumorais, como as células do melanoma. Quando o ligando PD-L1 se liga aos receptores PD-1, ocorre regulação negativa da função das células T, inibição da produção da IL-2, diminuindo a proliferação das células T (Figura 9) (50,55,56).

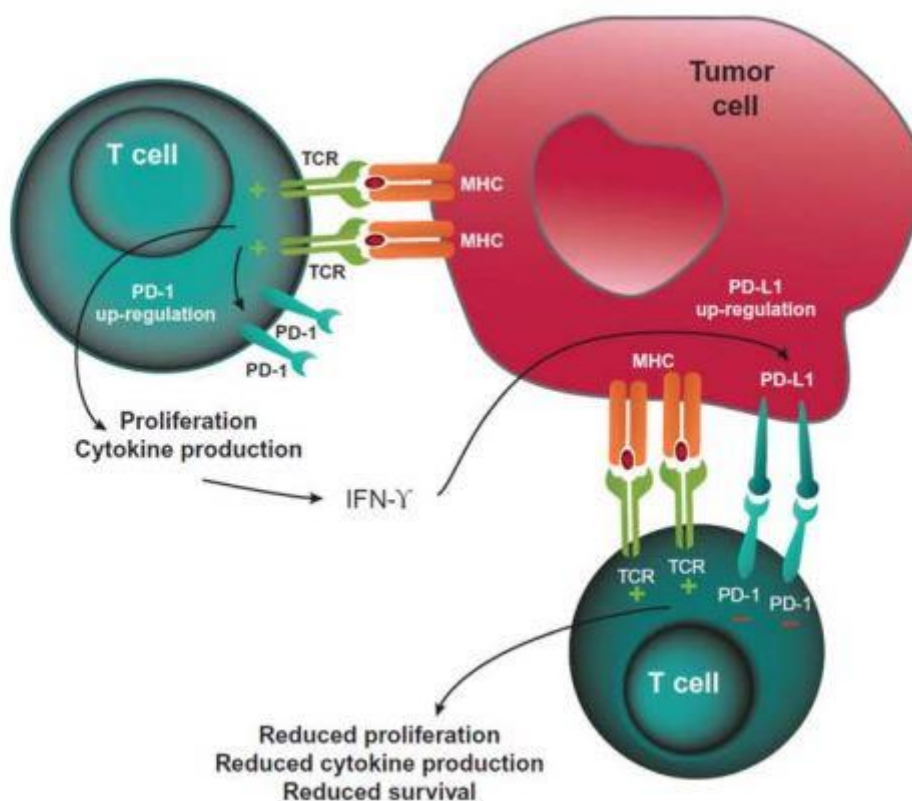


Figura 9 – Inibição dos linfócitos T mediada pelo PD-1(54)

A expressão elevada de PD-L1 está relacionada com um mau prognóstico e baixa sobrevivência em vários tipos de cancro como o carcinoma das células renais, carcinoma do ovário e melanoma. Contudo, estudos mais recentes mostraram que a

expressão de PD-L1 no melanoma metastático está relacionada com a presença de linfócitos infiltrantes de tumor nos melanócitos. Assim, vários anticorpos monoclonais anti-PD-1 são atualmente utilizados, mostrando atividade promissora no tratamento do melanoma avançado (50).

Enquanto o CTLA-4 exerce a sua função durante a fase de iniciação das células T, o PD-1 atua na fase efetora, como descrito na Figura 10 (55).

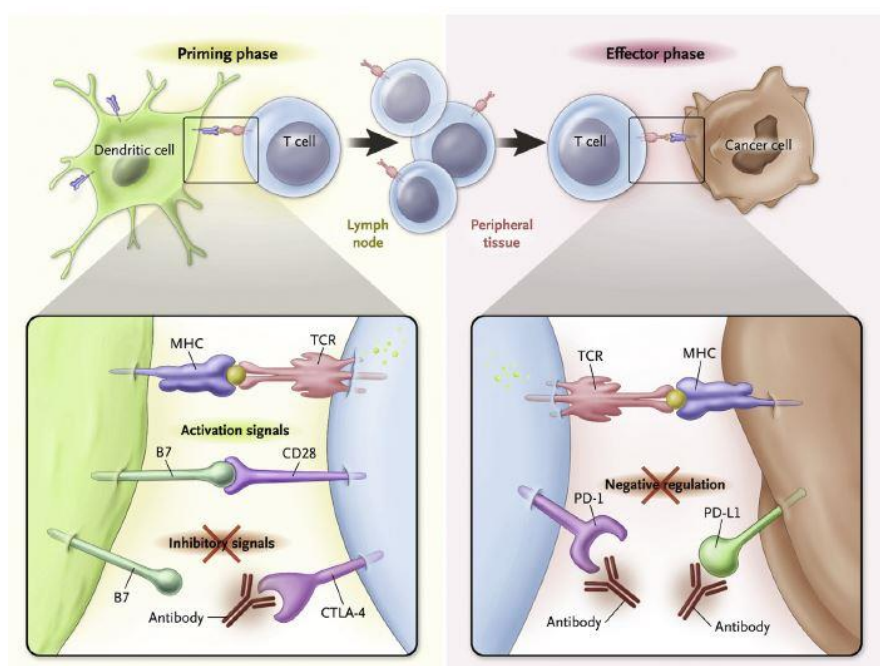


Figura 10 - Mecanismos de ação do CTLA-4 e do PD-1 (55)

A aprovação pela EMA do nivolumab baseou-se em dois ensaios clínicos de fase III: o CheckMate 006 (*Checkpoint pathway and nivolumab clinical trial evaluation*) (56) e o CheckMate 037. No CheckMate 006, participaram 418 indivíduos com melanoma irresssecável ou metastático sem mutações no gene BRAF, não tratados previamente. Os indivíduos foram tratados ou com nivolumab 3 mg/Kg de peso corporal ou com DTIC 1000 mg/m² a cada três semanas. Os indivíduos tratados com nivolumab apresentaram uma redução de 58% do risco de morrer e a sobrevivência global a um ano foi de 72,9% , sendo esta de 42,1% no grupo tratado com DTIC. A sobrevivência média sem progressão da doença foi de 5,1 meses para o nivolumab e de 2,2 meses para a DTIC. A taxa de resposta com nivolumab foi de 40% enquanto que, com a

DTIC, foi de 13,9%. Além disso, observou-se um perfil de segurança favorável no tratamento com nivolumab comparando com a DTIC (55)(59).

O CheckMate 037, demonstrou que os indivíduos previamente tratados com ipilimumab (ou ipilimumab e um inibidor BRAF caso se tratasse de um melanoma BRAFV600 positivo) podiam ainda responder ao nivolumab. Um dos grupos foi tratado com nivolumab 3 mg/Kg de peso corporal a cada duas semanas e o outro grupo foi tratado com DTIC 1000 mg/m² a cada 3 semanas. A taxa de resposta com o nivolumab foi de 31,7% e com a DTIC foi de 10,6% (55) (59).

O pembrolizumab foi aprovado com base num ensaio clínico de fase I, o Keynote-001, num ensaio de fase II, o Keynote-002 e num de fase III, o Keynote-006. No ensaio clínico de fase I, avaliou-se inicialmente três doses diferentes: 1, 3 e 10 mg/kg de peso corporal a cada duas semanas. Os indivíduos com melanoma avançado que não foram previamente tratados com ipilimumab e os previamente tratados com ipilimumab receberam pembrolizumab (10 mg/kg ou 2 mg/kg). A taxa de sobrevivência global foi de 44% nos indivíduos não tratados previamente, 40% não tratados previamente com ipilimumab e 28% nos tratados com ipilimumab previamente. A sobrevivência média sem progressão da doença foi de 5,5 meses e a sobrevivência global a 1 ano foi de 69%. O ensaio clínico de fase II avaliou duas doses de pembrolizumab (2 ou 10 mg/kg) comparados com um fármaco citotóxico em doentes com melanoma avançado. Ambas as doses aumentaram a sobrevivência sem progressão da doença em comparação com a quimioterapia. No ensaio clínico de fase III, comparou-se com o ipilimumab com dois esquemas de dosagens diferentes do pembrolizumab (10 mg/kg a cada 2 semanas ou a cada 3 semanas). A taxa de resposta global foi de 33% com o pembrolizumab e de 12% com o ipilimumab. A sobrevivência sem progressão de doença após 6 meses foi de 45% com o pembrolizumab e de 26% com o ipilimumab e a sobrevivência global foi de 87% vs 75%. A 12 meses, a sobrevivência global foi de 74% (grupo de tratamento a cada 2 semanas) e de 68% (grupo de tratamento a cada 3 semanas) para o grupo tratado com pembrolizumab e de 58% para o grupo tratado com ipilimumab. Após 24 meses, 55% dos pacientes tratados com pembrolizumab sobreviveram, dos quais aproximadamente 30% não apresentavam progressão da doença (50).

10.1.3. Terapêutica combinada com anti-CTLA-4 e anti-PD-1

Com base em ensaios clínicos, provou-se que a inibição de dois *checkpoints* imunitários (anti-PD-1 e anti-CTLA-4) levava ao aumento da infiltração de linfócitos T, observando-se um aumento significativo da eficácia antitumoral desta terapêutica combinada em comparação com a terapêutica com ipilimumab em monoterapia (52).

Atualmente, considera-se que a combinação de inibidores de *checkpoints* imunitários é a melhor opção terapêutica nos casos em que a expressão de PD-1 é inferior a 5%. Caso contrário, considera-se que a utilização de nivolumab em monoterapia é suficiente para obter resultados satisfatórios em termos de sobrevivência com um perfil de toxicidade inferior. O ipilimumab não é considerado como tratamento de primeira linha no tratamento do melanoma metastático e o nivolumab ou o pembrolizumab devem ser administrados em monoterapia ou em combinação com anticorpos anti-CTLA-4 (52).

10.2. Terapêuticas direcionadas

A identificação de mutações e aberrações genéticas nas células do melanoma permitiram o desenvolvimento de inibidores direcionados para vias celulares específicas ou para oncogenes mutantes, com o objetivo de melhorar a sobrevivência dos indivíduos com melanoma avançado. Apesar de vários genes poderem apresentar mutações ou aberrações, incluindo o gene NRAS, o cKIT, o NF1, o PTEN e o CDKN24, atualmente, apenas a mutação BRAFV600 é clinicamente relevante. Assim sendo, esta é a única mutação com terapêuticas direcionadas (inibidores BRAF e MEK) que demonstrou um impacto na sobrevivência global dos indivíduos com melanoma metastático (49).

Ao longo dos últimos anos, observou-se um aumento no desenvolvimento das terapêuticas direcionadas, após a descoberta de que o melanoma geralmente apresenta mutações no gene BRAF (40 a 60% dos casos). Este gene tem como função regular a via de sinalização da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK), sendo que as mutações podem levar à proliferação celular desregulada, levando ao crescimento tumoral. Aproximadamente 90% das mutações no gene BRAF consistem em substituições, a nível dos ácidos nucleicos, do ácido glutâmico pelo aminoácido valina no codão 600, denominando-se mutações BRAFV600E. No entanto, são ainda

conhecidas outras mutações, nomeadamente BRAFV600K e BRAFV600R. As mutações BRAFV600K são mais frequentemente encontradas em indivíduos com idade >65 anos e/ou com evidência de exposição crónica aos raios UV (12,35,60,61).

A via MAPK, tal como outras vias de sinalização, é essencial para a sobrevivência e manutenção normal das células bem como para a formação e progressão tumoral, encontrando-se frequentemente hiperativada nos tumores malignos. É composta por proteínas cinases RAF, MEK e ERK também frequentemente denominadas MAPK kinase kinase, MAPK kinase e MAPK, respetivamente. Em resposta a um estímulo externo, ocorre a ativação do recetor da tirosina-cinase (RTK), levando ao recrutamento de GEF (fatores de troca de nucleotídeo guanina). O GEF vai ativar proteínas da família RAS, através da troca de GDP por GTP. A proteína RAS ativada (ligada a GTP), recruta proteínas RAF (ARAF, BRAF, CRAF) para a membrana celular, onde estas se ativam. Após a sua ativação, ocorre uma série de fosforilações, resultando por fim na ativação de proteínas ERK. Por sua vez, estas fosforilam diversos substratos no citoplasma, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo (Figura 11). Como resultado desta cascata de sinalização observa-se a regulação de diversas proteínas e de fatores de transcrição relacionados com a proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e apoptose (62–64).

A ativação da via MAPK desempenha um papel fundamental no melanoma pois, nas células de melanoma BRAFV600 positivo, a ativação desta via ocorre de maneira diferente. Nestas células, a ativação BRAFV600 não necessita da interação RTK-ligando pois os monómeros BRAFV600 ativam-se constitutivamente, levando à ativação contínua da via MAPK. Assim, durante a formação e progressão das células cancerígenas, a regulação da via MAPK é interrompida e ocorre uma hiperativação desta via, contribuindo para o desenvolvimento e propagação das células cancerígenas.(62–64)

Atualmente, os fármacos inibidores do gene BRAFV600E aprovados para o tratamento do melanoma em estadios avançados são o vemurafenib e o dabrafenib (35). O vemurafenib é um potente inibidor do gene BRAF mutado, apresentando efeitos antitumorais notórios, sendo o primeiro fármaco aprovado pela FDA, em 2011, para este tipo de mutação (61)(65).

Num ensaio clínico de fase III (BRIM-3), conduzido em indivíduos com melanoma metastático, sem tratamento prévio, mostrou-se que o vemurafenib apresenta inúmeras vantagens em relação ao comparador, a DTIC. O vemurafenib apresentou uma sobrevivência global de 13,6 meses em contraste com a DTIC que apresentou 9,7 meses (65).

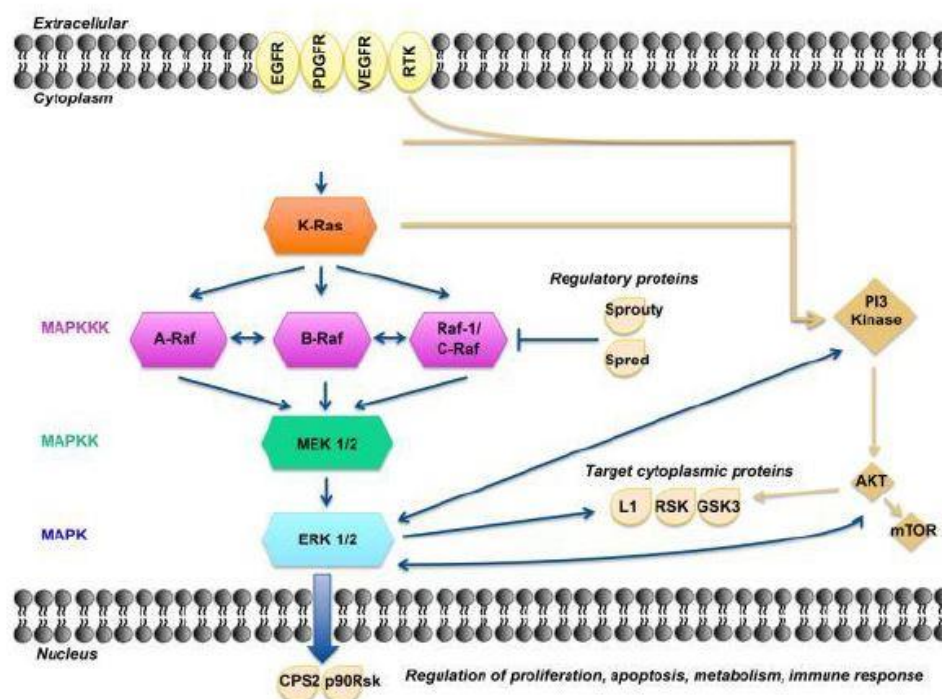


Figura 11 –Esquemática da via MAPK (63)

Num outro ensaio clínico fase III com 675 participantes, utilizando os mesmos fármacos, após o tratamento com vemurafenib, comparando os resultados com os obtidos no tratamento com a DTIC, observou-se uma redução do risco de morrer em 63% e de 74% no risco progressão tumoral em doentes não tratados previamente com melanoma em estadios III irrecorrível ou estadios IV com mutação BRAFV600E. Os resultados do estudo demonstraram ainda que, nos doentes tratados com vemurafenib, observou-se uma taxa de resposta de 48% comparando com uma taxa de 5% da DTIC (61).

No ensaio clínico BREAK 3, o tratamento com dabrafenib, também um inibidor BRAF, comparado com o tratamento com DTIC, apresentou benefícios semelhantes no tratamento do melanoma metastático, obtendo uma sobrevivência global de 16,6

meses e uma sobrevivência sem progressão de doença de 6,9 meses. Mais recentemente, um novo inibidor BRAF, o encorafenib, mostrou melhorar a sobrevivência sem progressão de doença (65).

A utilização de inibidores BRAF em monoterapia induzem respostas rápidas em praticamente todos os indivíduos com melanoma metastático com mutação BRAF, no entanto, frequentemente ocorre uma rápida recorrência da doença, pois surgem resistências secundárias, levando à reativação da via MAPK (65).

A adição de inibidores MEK ao tratamento com inibidores BRAF mostrou prolongar a sobrevivência global e a sobrevivência sem progressão de doença e diminuir a toxicidade dos inibidores BRAF utilizados em monoterapia. Diversos ensaios clínicos de fase III (COMBI-d, COMBI-V, coBRIM e, mais recentemente, COLOMBUS) demonstraram vantagens no tratamento combinado de inibidores BRAF com inibidores MEK, comparando com o tratamento com inibidores BRAF em monoterapia, em indivíduos com melanoma metastático não tratados previamente. Com a junção do trametinib (inibidor MEK) ao dabrafenib, obteve-se uma taxa de resposta global de 69%, uma sobrevivência global de 25,1 meses, comparando com 18,7 meses obtidos com o dabrafenib em monoterapia. Relativamente à sobrevivência sem progressão de doença, obteve-se 11,1 meses com trametinib + dabrafenib e de 8,8 meses com a dabrafenib. A combinação do trametinib + dabrafenib foi aprovada pela FDA em 2014. Foi ainda estudada a junção do colimetinib (inibidor MEK) + vemurafenib (inibidor BRAF), que apresentou semelhantes taxas de resposta, sobrevivência global e sobrevivência sem progressão de doença, sendo esta combinação aprovada pela FDA em 2015. Estudos muito recentes, apresentaram resultados semelhantes para a junção encorafenib + binimetinib (65).

O tratamento do melanoma metastático com mutação no gene BRAF com a utilização de terapêuticas direcionadas para a via MAPK (inibidores BRAF/MEK) e inibidores de *checkpoints* imunitários revolucionou o tratamento e melhorou os resultados da doença em estadios avançados. Inicialmente estas terapêuticas mostram-se bastante eficazes, contudo, a resistência aos inibidores BRAF ocorre entre 6 a 8 meses em 50% dos pacientes tratados com vemurafenib ou dabrafenib em monoterapia. No entanto, a resistência à terapêutica combinada de um inibidor BRAF com um inibidor MEK

ocorre mais tardiamente. Em aproximadamente 12 meses, surge resistência adquirida à terapêutica com inibidores MAPK na maioria dos indivíduos, existindo diversos mecanismos que conduzem a esta resistência. Assim, torna-se fundamental compreender os mecanismos de resistências de modo a desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes para o melanoma metastático com mutação no gene BRAF (66)(67).

A reativação da via MAPK ocorre em 79% dos casos de resistência tumoral, no entanto apenas 58% dos tumores em progressão têm um mecanismo específico de resistência identificado. O principal mecanismo de resistência da terapêutica com inibidores BRAF ocorre através da reativação da via MAPK, levando à ativação contínua da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) na presença de inibição BRAF. Observou-se que os mecanismos de reativação ERK estão presentes em 50 a 70% dos tumores resistentes apenas a um inibidor BRAF. Observou-se ainda que a reativação da via MAPK ocorre em cada 9 em 10 indivíduos que apresentam resistência à combinação de inibidores BRAF com inibidores MEK, resultando no aumento da ativação ERK. Outro dos mecanismos de resistência identificado corresponde à ativação de vias de sinalização paralelas, como a ativação de vias de sobrevivência alternativas, mediadas pelo recetor da tirosina cinase (RTK) (66).

A variedade de fatores genómicos, epigenéticos e extracelulares também afetam a forma como o melanoma responde e se torna resistente à terapêutica. A troca de fenótipo a nível molecular foi também identificada como um mecanismo relevante através do qual os tumores se tornam resistentes às terapêuticas direcionadas (67).

10.3. Terapêutica conjunta de inibidores BRAF ou MEK com imunoterapia

Com o passar dos anos, têm surgido mais evidências de que o uso de inibidores BRAF/MEK pode resultar na ativação do sistema imunitário. Observou-se um aumento significativo das células T CD4⁺ e CD8⁺ de infiltração tumoral após o tratamento com vemurafenib ou dabrafenib e, este aumento das células T está relacionado com a redução do tamanho do tumor e com o aumento da necrose. Além disso, a realização de biópsias em indivíduos com progressão da doença mostrou que a densidade de células T CD4/CD8⁺ foi reduzida para níveis anteriores ao tratamento

com inibidores BRAF. Estas observações indicam que os inibidores BRAF podem aumentar a capacidade das células T citotóxicas se infiltrarem no melanoma metastático. Outros estudos, mostraram que o tratamento com inibidores BRAF induz a expressão de antígenos de superfície celular nas células de melanoma, que estimula o reconhecimento destas através de células T específicas para o antígeno (68).

A combinação dos inibidores BRAF/MEK com imunoterapia podem ter mecanismos complementares, o que pode aumentar as taxas de resposta comparadas com a utilização isolada de imunoterapia e aumentar a duração das respostas obtidas com a utilização de terapêuticas direcionadas em monoterapia (68).

11. Conclusões e perspectivas futuras

As células de melanoma apresentam elevada heterogeneidade genética, com diferentes tipos de mutações, uma capacidade aumentada para inibirem os *checkpoints* imunitários, adaptam as suas respostas ao tratamento, o que leva ao desenvolvimento de resistências, apresentando ainda elevadas taxas de progressão de doença mesmo após o tratamento (69).

Apesar de serem necessárias várias décadas para a descoberta de novos tratamentos para o melanoma metastático, os avanços na tecnologia permitiram o desenvolvimento de novas formas de tratamento, com taxas de mortalidade melhoradas, permitindo também a identificação de diversas mutações genómicas (69).

As opções terapêuticas no tratamento do melanoma metastático tem sido alvo de grandes progressos revolucionários através da descoberta de terapias direcionadas com eficácia molecular demonstrada, como os inibidores BRAF e MEK, e imunoterapias (anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1) que melhoram significativamente o padrão de tratamento do melanoma. Sabe-se que é bastante improvável que a utilização de agentes terapêuticos em monoterapia conduza a benefícios a longo prazo devido ao desenvolvimento de resistências, pelo que as estratégias de desenvolvimento de terapêutica combinadas são a chave para superar as resistências e obter respostas a longo prazo (48).

Atualmente, são estudadas diversas abordagens de terapêuticas combinadas, sendo pontos fundamentais no desenvolvimento destas terapêuticas a altura ideal de

administração e os esquemas de combinação das mesmas de forma a obter a melhor eficácia, duração da resposta e a menor toxicidade possível (48).

Futuramente, torna-se necessário o estudo de biomarcadores de modo a personalizar o tratamento individual para doentes com melanoma metastático e são necessárias mais pesquisas de modo a melhorar os resultados terapêuticos em doentes com um prognóstico mais desfavorável (por exemplo, elevados níveis de LDH) ou com metástases cerebrais pois estas são duas populações pouco representadas nos ensaios clínicos realizados (58).

12. Referências bibliográficas

1. Importance of melanoma prevention, early detection. [Internet]. Rockville: American Academy of Dermatology; 2017 [cited 2019 Jun 13]. Available from: www.sciencedaily.com/releases/2017/03/170303091710.htm
2. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther*. 2018;7:35–49.
3. Linos E, Katz KA, Colditz GA. Skin Cancer—The Importance of Prevention. *JAMA Intern Med*. 2016;176(10):1435–6.
4. Merry AF, Shuker C, Hamblin R. Patient safety and the Triple Aim. *Intern Med J*. 2017;47(10):1114–21.
5. Liu-Smith F, Jia J, Zheng Y. UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. Ahmad S, editor. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 996. Springer, Cham; 2017. 27–40 p.
6. Arozarena I, Wellbrock C. Targeting invasive properties of melanoma cells. *FEBS J*. 2017;284(14):2148–62.
7. Kalal BS, Upadhyay D, Pai VR. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. *Oncol Rev*. 2017;11(1):1–15.
8. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;115:36–49.
9. Leonardi G, Salemi R, Spandidos D, Libra M, Candido S, Zanghì A, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018;52(4):1071–80.
10. Iams WT, Sosman JA, Chandra S. Novel Targeted Therapies for Metastatic Melanoma. *Cancer J*. 2017;23(1):54–8.
11. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1:1–20.
12. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(8):463–82.
13. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. In *Vivo (Brooklyn)*. 2014;1012:1005–11.
14. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(2105–

- 2110).
15. Weiss S, Hanniford D, Hernando E, Osman I. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer*. 2015;121(23):4108–23.
 16. Rastrelli M, Tropea S, Pigozzo J, Bezzon E, Campana LG, Stramare R, et al. Melanoma m1: Diagnosis and therapy. In *Vivo (Brooklyn)*. 2014;28(3):273–86.
 17. WHO | Skin cancers [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 2019 Mar 21]. Available from: <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
 18. Karimkhani C, Green AC, Nijsten T, Weinstock MA, Dellavalle RP, Naghavi M, et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):134–40.
 19. SEER Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin [Internet]. Maryland: National Cancer Institute; 2019 [cited 2019 Mar 21]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
 20. Instituto Nacional de Estatística IP. Causas de morte 2017 [Internet]. Lisboa: INE; 2019 [cited 2019 Mar 21]. 143 p. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358633033&PUBLICACOESmodo=2
 21. Risk Factors for Melanoma Skin Cancer [Internet]. Risk Factors for Melanoma Skin Cancer. Atlanta: American Cancer Society; 2016 [cited 2019 Apr 25]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
 22. Evans MS, Robertson GP, Drabick JJ. Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 2013;779:223–55.
 23. Shellenberger R, Nabhan M, Kakaraparthi S. Melanoma screening: A plan for improving early detection. *Ann Med*. 2016;48(3):142–8.
 24. Thomas L, Puig S. Dermoscopy, digital dermoscopy and other diagnostic tools in the early detection of melanoma and follow-up of high-risk skin cancer patients. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:14–21.
 25. Tsao H, Olazagasti JM, Cordero KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):717–23.
 26. Curkovic D, Pastar Z, Kostovic K. Dermoscopy and Early Melanoma. *Coll Antropol*. 2015;39(3):791–5.
 27. Lima JP da SN, Georgieva M, Haaland B, Lopes G de L. A systematic review

- and network meta-analysis of immunotherapy and targeted therapy for advanced melanoma. *Cancer Med.* 2017;6(6):1143–53.
28. Wu S, Singh RK. Resistance to Chemotherapy and Molecularly Targeted Therapies: Rationale for Combination. *Curr Mol Med.* 2011;11(7):553–63.
 29. National Institute for Health and Care Excellence. Systemic anticancer therapies apies for stage IV melanoma [Internet]. *Melanoma.* 2019. 1–11 p. Available from: <http://pathways.nice.org.uk/pathways/melanoma>
 30. Henriques V, Martins T, Link W, Ferreira BI. The Emerging Therapeutic Landscape of Advanced Melanoma. *Curr Pharm Des.* 2018;24(5):549–58.
 31. Francisco AP, Mendes E, Santos AR, Perry MJ. Anticancer Triazenes : from Bioprecursors to Hybrid Molecules. *Curr Pharm Des.* 2019;25(1):1–21.
 32. PubChem [Internet]. Dacarbazine. 2019 [cited 2019 May 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398738>
 33. Al-Badr AA, M.Alodhaib Ma. Dacarbazine. In: Harry G. Brittain, editor. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology.* Elsevier; 2014. p. 323–77.
 34. Murray A. Dacarbazine. In: ELSEVIER, editor. *Encyclopedia of Toxicology.* Third. Fort Wayne; 2014. p. 1132–4.
 35. Hashim PW, Friedlander P, Goldenberg G. Systemic therapies for late-stage melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016;9(10):36–40.
 36. Sousa A, Santos F, Gaspar MM, Calado S, Pereira JD, Mendes E, et al. The selective cytotoxicity of new triazene compounds to human melanoma cells. *Bioorganic Med Chem.* 2017;25(15):3900–10.
 37. Arias JC, Jasiulionis MG. Melanoma: Treatments and Resistance. In: Duc GHT, editor. *Melanoma - From Early Detection to Treatment.* Intech Open; 2012. p. 439–73.
 38. Moitra K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–8.
 39. Zaal EA, Berkers CR, Chen S. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol.* 2018;8:1–15.
 40. Lage H. Gene Therapeutic Approaches to Overcome ABCB1-Mediated Drug Resistance. *Curr Strateg Cancer Gene Ther.* 2016;209:87–94.
 41. Hida K, Kikuchi H, Maishi N, Hida Y. ATP-binding cassette transporters in tumor endothelial cells and resistance to metronomic chemotherapy. *Cancer Lett.* 2017;400:305–10.

42. Adamska A, Falasca M. ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? *World J Gastroenterol.* 2018;24(29):3222–36.
43. Cui H, Zhang A, Chen M, Liu J. ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr Drug Targets.* 2015;16(12):1356–71.
44. Röckmann H, Schadendorf D. Drug resistance in human melanoma: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie.* 2003;26(6):581–7.
45. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1769–92.
46. Mandalà M, Tondini C, Merelli B, Massi D. Rationale for New Checkpoint Inhibitor Combinations in Melanoma Therapy. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(5):597–611.
47. da Silveira Nogueira Lima JP, Georgieva M, Haaland B, de Lima Lopes G. A systematic review and network meta-analysis of immunotherapy and targeted therapy for advanced melanoma. *Cancer Med.* 2017;6(6):1143–53.
48. Najem A, Krayem M, Perdrix A, Kerger J, Ahmad A, Journe F, et al. New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer Res.* 2017;37(11):5941–53.
49. Silva IP, Long G V. Systemic therapy in advanced melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2017;29(6):484–92.
50. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *J Hematol Oncol.* 2017;10(88):1–9.
51. Herzberg B, Fisher DE. Metastatic melanoma and immunotherapy. *Clin Immunol.* 2016;172:105–10.
52. Lugowska I, Teterycz P, Rutkowski P. Immunotherapy of Melanoma. *Contemp Oncol.* 2018;22(1A):61–7.
53. Loo K, Daud AI. Inhibitors of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 and Programmed Death 1/Programmed Death 1 Ligand for Metastatic Melanoma, Dual Versus Monotherapy - Summary of Advances and Future Directions for Studying These Drugs. *Cancer J (United States).* 2017;23(1):3–9.
54. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98–106.
55. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D.

- Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):604–11.
56. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(8):473–86.
 57. Lindsay CR, Waterston A, Spiliopoulou P. Blinded by the light: Why the treatment of metastatic melanoma has created a new paradigm for the management of cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7(2):107–21.
 58. Rozeman EA, Dekker TJA, Haanen JBAG, Blank CU. Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(3):303–17.
 59. Long G V., Atkinson V, Ascierto PA, Robert C, Hassel JC, Rutkowski P, et al. Effect of nivolumab on health-related quality of life in patients with treatment-naïve advanced melanoma: Results from the phase III CheckMate 066 study. *Ann Oncol*. 2016;27(10):1940–6.
 60. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):323–32.
 61. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. Vol. 364, *N Engl J Med*. 2011.
 62. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*. 2017;73:85–92.
 63. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new prespective. *Cancer*. 2014;120(22):3446–56.
 64. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50–83.
 65. Malissen N, Grob JJ. Metastatic Melanoma: Recent Therapeutic Progress and Future Perspectives. *Drugs*. 2018;78(12):1197–209.
 66. Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long G V. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur J Cancer*. 2016;62:76–85.
 67. Brighton HE, Angus SP, Bo T, Roques J, Tagliatela AC, Darr DB, et al. New

- mechanisms of resistance to MEK inhibitors in melanoma revealed by intravital imaging. *Cancer Res.* 2019;78(2):542–57.
68. Simeone E, Grimaldi AM, Festino L, Vanella V, Palla M, Ascierto PA. Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care. *BioDrugs.* 2017;31(1):51–61.
 69. Gladfelter P, Darwish NHE, Mousa SA. Current status and future direction in the management of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2017;1–8.